

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Vergleich der Restaktivität der menschlichen
Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit
Diisopropylfluorophosphat
in drei unterschiedlichen Konzentrationen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Thomas Jahn
aus Sonnefeld

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wüermeling

Vergleich der Restaktivität der menschlichen
Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit
Diisopropylfluorphosphat
in drei unterschiedlichen Konzentrationen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Thomas Jahn
aus Sonnefeld

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan : Prof. Dr. W. Kersten
Referent : Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-V. Mallinckrodt
Korreferent : Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung : 15.12.1980

<u>Inhaltsverzeichnis :</u>	Seite
I. Einleitung	3
1. Beschreibung von DFP	3
a) physikalische und chemische Eigenschaften	3
b) pharmakologische Eigenschaften	10
α) DFP als Cholinesterasehemmstoff	10
β) Intoxikation mit DFP	11
γ) DFP als Medikament	11
2. Schicksal des DFP im Säugetierorganismus	12
a) Verteilung im Körper	12
b) Abbau und Ausscheidung	13
c) Problematik der "DFP-ase"	15
II. Problemstellung	19
III. Experimentelle Untersuchung	20
1. Gewinnung des Serums	20
2. Beschreibung des angewandten Meßverfahrens	20
3. Inkubationsbedingungen für DFP	23
4. Messung der ChE-Aktivitäten	24
5. Präzisionsmessung und Richtigkeitskontrollen	26
6. DFP-Konzentration	26
IV. Untersuchungsergebnisse	28
V. Auswertung	32
VI. Diskussion	39
VII. Zusammenfassung	60
VIII. Literaturverzeichnis	63

Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen :

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
BCJ	Butyrylcholinjodid
ChE	Cholinesterase
DFP	Diisopropylfluorphosphat
DFP-ase	Diisopropylfluorphosphatase
DIP	Diisopropylphosphat

I. Einleitung

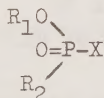
Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Vergleich der Restaktivitäten der menschlichen Serum-Cholin-esterase nach Vergiftung mit Diisopropylfluorophosphat (DFP) in drei unterschiedlichen Konzentrationen . Unter anderem soll damit auch die Frage der Klärung ein Stück näher gebracht werden , ob im menschlichen Serum ein Enzym existiert , das in der Lage ist , DFP abzubauen . Zum besseren Verständnis muß deshalb zunächst eine Beschreibung des DFP und seines Schicksals im Säugetierorganismus erfolgen .

1. Beschreibung von DFP

a) physikalische und chemische Eigenschaften

DFP gehört in die Stoffklasse der organischen Phosphorsäureester . Obwohl diese Stoffklasse bereits seit Mitte des vorigen Jahrhunderts bekannt war , erfolgte die systematische Untersuchung erst in den 30er Jahren unseres Jahrhunderts . 1932 entdeckten LANGE und VON KRÜGER die toxischen Eigenschaften der Alkylester der Fluorphosphorsäure . In den darauffolgenden Jahren wurden weitere organische Phosphorsäureester entdeckt . Als die bekanntesten Vertreter seien hier nur E 600 , E 605 , Soman , Sarin und Tabun genannt . Alle diese Gifte lassen sich auf eine einfache gemeinsame Strukturformel zurückführen (Abb. 1) .

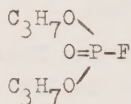
Abb. 1 : Allgemeine Strukturformel der organischen Phosphatverbindungen nach MOUNTER (1963)



Hierbei muß R_1 eine Alkylgruppe, R_2 eine Alkyl-, Alkoxy- oder Diäthylaminogruppe sein. An die Stelle des X kann CN, Fluor, eine Pyrophosphat- oder Arylgruppe treten.

DFP wurde erstmals 1938 von Schrader in Deutschland synthetisiert. Unabhängig hiervon stellten 1941 Mc Combie und Saunders in England ebenfalls DFP her (SCHRADER 1963). Beim DFP sind R_1 und R_2 Isopropylgruppen, und an die Stelle des X tritt Fluor. Damit ergibt sich folgende Strukturformel für DFP (Abb. 2).

Abb. 2 : Diisopropylfluorophosphat



Beim DFP handelt es sich unter Normalbedingungen um eine angenehm riechende, nur zu 1,5% bei 20°C in Wasser lösliche Flüssigkeit von hohem Dampfdruck (SCHRADER 1963). Die Dichte beträgt 1,0622 g/cm³ bei 20°C, das Molgewicht 184,2 g/Mol. Der Siedepunkt liegt für 760 mmHg bei 183°C, der Gefrierpunkt bei -82°C. Während die Löslichkeit für DFP in Wasser gering ist, besteht gute Löslichkeit in Alkoholen, Aceton, Aether, Benzin und Ölen. Deshalb wird DFP auch üblicherweise in der Medizin in Erdnußöl gelöst. Ein weiterer Grund für die Lösung des DFP in Erdnußöl besteht darin, daß es derart gelöst nach drei Monaten noch wirksam ist, während in 1% iger wäßriger Lösung DFP nach 72 Stunden zerfällt (QUILLIAM 1947, LEOPOLD et al. 1946, RAMACHANDRAN 1971).

Während gasförmiges DFP in geringen Konzentrationen

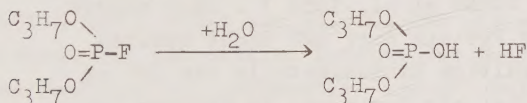
farb- und geruchlos ist , reicht die Palette der Beschreibungen der Geruchsqualitäten in höheren Konzentrationen von pfefferminzartig , süß über ätherisch bis ammoniakartig , scharf (SILVER 1948) .

Wie schon oben angedeutet , ist DFP in wäßrigen Lösungen instabil und zerfällt auf Grund spontaner Hydrolyse . Die Halbwertszeit von DFP in Wasser beträgt etwa 16 Stunden .

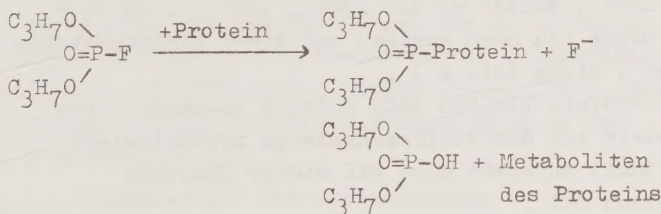
Neben dieser spontanen Hydrolyse bestehen in vivo noch zwei weitere Reaktionsmöglichkeiten . Zum einen die irreversible Bindung an Proteine (COHEN et al. 1954) , zum anderen die enzymatische Hydrolyse (MOUNTER et al. 1954) . Die folgende Abb. 3 gibt die drei Reaktionsmöglichkeiten des DFP in lebenden Organismen wieder .

Abb. 3 : Reaktionsmöglichkeiten des DFP in vivo

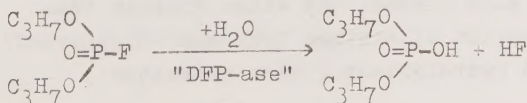
a) spontane Hydrolyse



b) Bindung an Proteine



c) enzymatische Hydrolyse



Während die Spontanhydrolyse in vitro bedeutsam ist , spielt sie in lebenden Organismen kaum eine Rolle . Die Menge des "freien" DFP im Organismus ist nämlich auf Grund der hohen Affinität zu Proteinen sehr klein . Nach einer Stunde läßt sich bereits kein "freies" DFP mehr im Organismus nachweisen (LATKI et al. 1961) . Das Reaktionsprodukt der Hydrolyse stellt neben F^- das Diisopropylphosphat (DIP) dar .

Bei der Bindung des DFP an ein Protein geschieht prinzipiell dasselbe wie bei der später beschriebenen enzymatischen Hydrolyse . Nur wird bei der Reaktion des DFP mit einem Protein die Bindung nach kurzer Zeit irreversibel , sodaß als Reaktionsprodukt ein DIP-Protein-Komplex wieder neben F^- entsteht . Dabei spielt es allerdings keine Rolle , ob das Protein Enzymcharakter besitzt oder nicht . Voraussetzung für einen derartigen DIP-Protein-Komplex muß lediglich sein , daß das Protein keine "DFP-ase"-Eigenschaft besitzt (COHEN et al. 1954) . Oder anders ausgedrückt , das Protein darf DFP nicht spalten können . Als endgültige Bindungsstelle des DFP am Protein wird hierbei ein Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms diskutiert (OOSTERBAAN et al. 1958 , WÄHLBY 1968 , WÄHLBY et al. 1966 , 1968) . Im folgenden werde ich noch genauer auf diese Bindungsstelle eingehen (siehe Abb. 4) .

DIP und Protein bleiben dann solange zusammen , bis das Protein auf dem Stoffwechselwege metabolisiert wird . Damit entsteht auch bei dieser Reaktion schließlich DIP .

Die enzymatische Hydrolyse läuft nun ihrerseits so ab , daß das DFP auch hierbei mit einem Protein reagiert . Dieses besitzt allerdings "DFP-ase"-Eigenschaft ; d.h. das DFP wird hydrolysiert , also gespalten ,

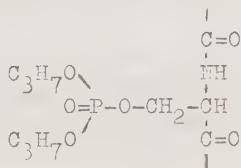
wobei das Enzym , die "DFP-ase" , unverändert aus der Reaktion herauskommt . Im Gegensatz zur "normalen" Bindung an ein Protein ist hier die Bindung DIP-Protein reversibel , auf Grund einer bestimmten Fähigkeit des Enzyms DIP wieder abzugeben (MOUNTER et al. 1954) . Es entsteht hierbei , wie bei den anderen beiden Reaktionswegen auch , neben F^- DIP als Reaktionsprodukt .

Das weitere Schicksal des DIP im Organismus ist im Abschnitt I 2b dieser Arbeit dargestellt .

Welche Kriterien entscheidend sind , ob DFP mit einem Protein mit Enzymcharakter eine irreversible oder reversible Bindung eingeht , soll im folgenden erklärt werden .

Die Mechanismen der Bindung des DFP an ein Protein wurden zuerst an den Esterasen untersucht (MAZUR et al. 1946) . Die Reaktion zwischen DFP und den verschiedenen Esterasen stellt eine stöchiometrische Reaktion dar , wobei ein Molekül DFP mit einem Aminosäurerest aus dem aktiven Zentrum des Enzyms reagiert . Diese Reaktion ist temperatur- und pH abhängig (NACHMANSOHN 1947 , 1948 , MOUNTER et al. 1957) . Bei weiteren Untersuchungen zeigte es sich , daß ein Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms für die Bindung des DIP an das Enzym verantwortlich ist (OOSTERBAAN et al. 1958 , WÄHLBY 1968 , WÄHLBY et al. 1966 , 1968) . Die Struktur dieser DIP-Serin-Bindung wird in der Abb. 4 wiedergegeben .

Abb. 4 : Struktur der DIP-Serin-Bindung



Diese Bindung ist irreversibel und hat eine Blockade des Enzyms zur Folge . Die Esterase ist somit gehemmt und kann keine Esterspaltung mehr vornehmen . Bevor es zu dieser irreversiblen Bindung des DFP an einen nicht N-terminalen Serinrest kommt , geht man allgemein davon aus , daß die DIP-Protein-Bindung noch eine kurze Zeit lang reversibel ist . Den Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Bindung nennt man "ageing process" , "Alterung" . Hierbei wurden drei Theorien über diesen Alterungsprozeß entwickelt . Zum einen wird eine räumliche Veränderung des Enzyms diskutiert (MOON et al. 1965) , zum anderen eine Wanderung des DIP vom primären Reaktionspartner zu einem nicht N-terminalen Serinrest (WOOTON et al. 1960) , und schließlich die Abspaltung einer Isopropylgruppe vom DIP-Enzym-Komplex (BEHRENDTS et al. 1959 , JANSZ et al. 1959) . Letzteres konnte bisher nur bei der Pseudochoolinesterase des Pferdes nachgewiesen werden . Die räumliche Wanderung des DIP vom primären Reaktionspartner , einem Imidazolring des Histidins (NEURATH 1965 , MOUNTER et al. 1957) , zum nicht N-terminalen Serinrest würde zumindest erklären , wann Enzyme irreversible Bindungen eingehen und wann sie reversibel mit DFP verbunden werden , also "DFP-ase"-Eigenschaft besitzen :
"DFP-ase"-Eigenschaft haben nach WOOTON et al. (1960) alle diejenigen Enzyme , in deren aktiven Zentrum sich zwar ein Histidin befindet , nicht jedoch ein nicht N-terminaler Serinrest in unmittelbarer Nachbarschaft .

Hieraus darf aber nicht geschlossen werden , das DFP könnte nur am aktiven Zentrum eines Enzyms angreifen , und je nachdem , ob ein nicht N-terminaler Serinrest

vorhanden ist , wäre das Enzym als irreversibel gebundenes Protein oder als "DFP-ase" anzusehen . Es besteht auch die Möglichkeit , daß das DFP mit Proteinen ohne Enzymcharakter oder Erythrozyten irreversible Bindungen eingeht ; weiter kann das DFP zwar mit Enzymen reagieren , aber an anderer Stelle als am aktiven Zentrum . So konnte MURACHI (1963) am Enzym Bromelain (E.C.3.4.2.2.5.) nachweisen , daß DFP zwar mit dem Enzym reagiert , aber keine Aktivitätsminderung eintritt .

Zusammenfassend kann man somit sagen :

DFP reagiert mit Proteinen , ganz gleich , ob diese Enzymcharakter besitzen oder nicht . Ebenso kann der Angriff des DFP am aktiven Zentrum von Enzymen erfolgen , als auch an anderer Stelle . Erfolgt der Angriff am aktiven Zentrum , so wird das DFP primär in Form von DIP an ein Histidin gebunden (NEURATH 1965 , MOUNTER et al. 1957) . Sekundär wandert dann das DIP an einen nicht N-terminalen Serinrest (WOOTON et al. 1960) . Grundsätzlich ist diese Bindung DIP-Protein irreversibel und besitzt die in Abb. 4 dargestellte Struktur (OOSTERBAAN et al. 1958 , WÄHLBY 1968 , WÄHLBY et al. 1966 , 1968) . Nur in den Fällen , in denen in der Nähe des Histidins kein nicht N-terminaler Serinrest zu finden ist , bleibt die Bindung reversibel (WOOTON et al. 1960) . Diese Enzyme besitzen dann "DFP-ase"-Eigenschaft .

b) pharmakologische Eigenschaften

α) DFP als Cholinesterasehemmstoff

Ursprünglich sollte DFP auf Grund seiner starken Wirkung als Kontaktinsektizid zur Anwendung gelangen . Aber seine große Toxizität auch gegenüber Warmblütern verhinderte seinen Einsatz auf dem landwirtschaftlichen Sektor . Diese Toxizität liegt darin begründet , daß DFP - wie schon erwähnt - in der Lage ist , die Cholinesterasen zu hemmen . Diese Eigenschaft wurde von MACKWORTH (1942) und MAZUR et al. (1946) erkannt bzw. nachgewiesen . Dabei zeigte sich in späteren Untersuchungen von HAWKINS et al. (1947) , daß die Pseudocholinesterase (E.C.3.1.1.8.) eine höhere Affinität zu DFP aufweist als die Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7.) . Die beiden Esterasen unterscheiden sich dadurch , daß die Acetylcholinesterase (eine andere Bezeichnung ist "spezifische" Cholinesterase) zellständig ist und als Substrat lediglich Acetylcholin umsetzt . Die Pseudocholinesterase (andere Bezeichnungen lauten "unspezifische" Cholinesterase , Butyrylcholinesterase , Serumcholinesterase) hingegen ist nicht zellständig und hydrolysiert außer Acetylcholin eine große Anzahl anderer Cholinester .

Die Bindung des DFP an die Esterasen folgt den oben beschriebenen Mechanismen : DFP ist als DIP am Serinrest der Esterase gebunden . Diese Bindung ist - wie schon erwähnt - irreversibel . Das hat eine Blockade der Esterase zur Folge , sodaß z.B. kein Acetylcholin mehr abgebaut wird .

Während eine fast vollständige Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) im Plasma noch nicht zu klinischen Vergiftungssymptomen führen muß (KOELLE et al. 1946a) , zeigt sich jedoch eine hohe Korrelation zwischen Ver-

giftungserscheinungen und der Abnahme der Cholinesteraseaktivität im Gewebe , speziell im Gehirn (FREEDMAN et al. 1949) .

β) Intoxikation mit DFP

Die meisten Symptome einer DFP-Intoxikation lassen sich dadurch erklären , daß das Acetylcholin (ACh) nicht mehr abgebaut werden kann , da die AChE blockiert ist . Daneben besitzt das DFP aber auch Eigenwirkungen . So wird z.B. eine nicotinähnliche Wirkung des DFP in hohen Dosen diskutiert (VERBEKE 1948 , 1949) .

Als Symptome nach Intoxikation mit DFP werden genannt : Muskelfaszikulationen , Miosis , vermehrte Salivation , gesteigerte Darmperistaltik , Diarrhoe und spontaner Urinabgang . Nach krampfartigen Anfällen tritt meist innerhalb weniger Stunden der Tod infolge einer Atemlähmung ein (HORTON et al. 1946) .

Die Therapie erfolgt heute mit Atropin , dem klassischen ACh-Antagonisten , Valium^R als Antikonvulsivum und Toxogonin^R als sogenannten Reaktivator . Zusätzlich wird noch CTMB (Natrium-3-chloro-2,5,6-trimethylbenzoat) empfohlen (RUMP et al. 1975) .

γ) DFP als Medikament

Früher wurde DFP bei Myasthenia gravis gegeben , wird allerdings auf Grund der toxischen Nebenwirkungen heute nicht mehr empfohlen (FORTH et al. 1975) . Dafür wird besser Neostigmin appliziert .

Bei der Therapie des mit Hypermetropie einhergehenden Strabismus convergens ist DFP trotz der Nebenwirkungen immer noch im Gebrauch und wird sogar von GELLMANN (1963 , 1964) empfohlen .

Außerdem findet DFP bei therapieresistenten Glaukompatienten als Mittel der 2. Wahl seine Verwendung . Hingegen hat sich DFP als radioaktiv markiertes

DF³²P in der Forschung bewährt . Es ist nämlich in der Lage , Blutkörperchen und Enzyme , mit denen es ja irreversible Bindungen eingeht , dauerhaft zu markieren . Somit leistet DF³²P bei der Analyse DFP-sensibler Enzyme einen wertvollen Dienst .

2. Schicksal des DFP im Säugetierorganismus

a) Verteilung im Körper

Um Aufschluß darüber zu erhalten , wie sich DFP im lebenden Organismus verteilt und ausgeschieden wird , injizierten JANDORF und MC NAMARA (1950) Meerschweinchen radioaktiv markiertes DF³²P intravenös . Die Dosis betrug 0,5 mg pro kg Körpergewicht . Sie konnten zeigen , daß DFP von allen Geweben aufgenommen wird . In der Leber , der Lunge und der Niere ist die DFP-Konzentration höher als im Plasma ; es reichert sich somit in diesen Organen an . In allen übrigen Geweben (Muskel , Gehirn) liegen die DFP-Konzentrationen tiefer als im Plasma . Außerdem stellten sie fest , daß nach 24 Stunden alles DFP an Proteine gebunden war , also kein "freies" DFP mehr existierte .

COHEN und WARRINGA (1954) injizierten fünf Probanden ebenfalls radioaktiv markiertes DF³²P intramuskulär in einer Dosis zwischen 0,24 mg und 1,99 mg . Dabei ergab sich , daß die Radioaktivität im Blut nach 90 Minuten ein Maximum erreicht , dann jedoch rasch abnimmt . Nach 27 Tagen waren im Blut nur noch Spuren des markierten Phosphors nachzuweisen ; dieser Phosphor wurde schließlich einzig als Diisopropylphosphat (DI³²P) , gebunden an Erythrozyten und Plasmaproteine , gefunden . Spätere Untersuchungen zeigten , daß das DI³²P auch an Leukozyten und Lymphozyten gebunden wird (ANDERSON et al. 1953 , BARR et al. 1975 , BENDTZEN et al. 1977 , HJORT et al. 1960 , KURTH et

al. 1961 , NOWOTNY et al. 1970) .

COHEN und WARRINGA (1954) stellten daraufhin ihr Verteilungsschema für DFP im menschlichen Organismus auf (Abb. 5) : Alles DFP , das nicht an Blutkörperchen und Plasmaproteine gebunden wird , wird in den durchbluteten Geweben wegen der hohen Affinität zu Proteinen absorbiert . Dort wird DFP teils als DIP an Proteine gebunden , teils der enzymatischen Hydrolyse durch eine "DFP-ase" unterzogen .

Eine Bestätigung dieser Ergebnisse ergaben die Untersuchungen von HANSEN et al. (1968a , 1968b) . Sie prüften die Verteilung von ^3H -markiertem DFP bei Meer-schweinchen und Katze . Niedrige Dosen (0,1 mg/kg) werden vor allem in der Lunge und im Serum gebunden . Höhere Konzentrationen (3 mg/kg und 6 mg/kg) verteilen sich gleichmäßig im Körper und reichern sich nur in Leber und Niere an .

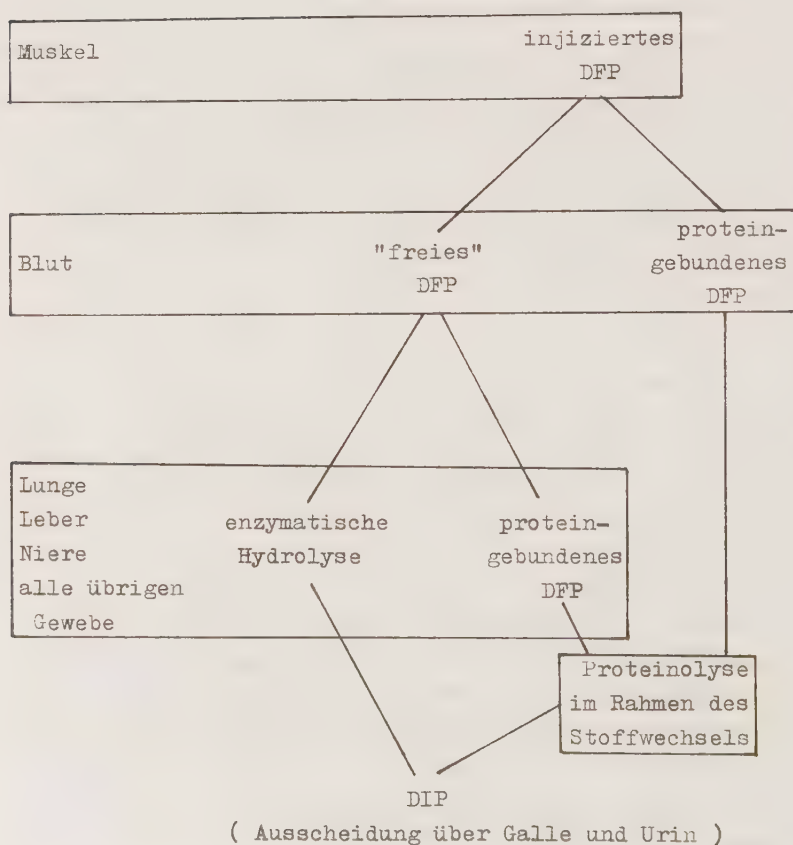
b) Abbau und Ausscheidung

Nach COHEN und WARRINGA (1954) wird das bei der Hydrolyse des DFP entstandene DIP , ohne im Gewebe gespeichert zu werden , sofort über Urin und Galle ausgeschieden . Das zunächst irreversibel an Proteine gebundene DIP wird erst dann frei , wenn das Protein metabolisiert wird . Dann wird auch dieser Teil des DIP über Urin und Galle ausgeschieden .

HANSEN et al. (1968a , 1968b) fanden , daß nach DFP Applikation dieses auch in sehr geringem Umfang unverändert ausgeschieden wird , und daß etwa 0,5% während der ersten zwei Stunden über die Lunge abge-atmet werden .

Zusammenfassend läßt sich somit über den Abbau und die Ausscheidung sagen :

Abb. 5 : Verteilungsschema des DFP im menschlichen Organismus nach intramuskulärer Applikation (COHEN et al. 1954) ; vom Verfasser vereinfacht



In den Geweben wird DFP entweder durch eine "DFP-ase" hydrolysiert , oder an Proteine gebunden . Werden diese Proteine verstoffwechselt , so entsteht - wie bei der Hydrolyse auch - DIP als Endprodukt . Dieses wird über Urin und Galle ausgeschieden .

Im Blut wird DFP an Proteine und Blutkörperchen gebunden und unterliegt danach denselben Gesetzen wie das im Gewebe an Proteine gebundene DFP . "Freies" DFP geht sofort vom Blut in die Gewebe und unterliegt dort dem oben geschilderten Abbau .

Daraus läßt sich schließen , daß das DFP im menschlichen Blut möglicherweise keinem enzymatischen Abbau unterliegt , daß somit im menschlichen Blut möglicherweise keine "DFP-ase" vorhanden ist .

c) Problematik der "DFP-ase"

Wie schon mehrmals erwähnt , gibt es ein Enzym , das die Fähigkeit besitzt , DFP hydrolytisch in DIP und HF zu spalten und hierbei unverändert aus der Reaktion herauskommt . Das Enzym hat also die Fähigkeit , DFP reversibel zu binden . Nach der Theorie von WOOTON et al. (1960) fehlt diesem Enzym in der Nähe des Histidins ein Serinrest . Man gab diesem Enzym , für das bisher kein natürliches Substrat existiert , die Bezeichnung Diisopropylfluorophosphatase , "DFP-ase" (E.C.3.8.2.1.) .

MAZUR (1946) konnte an "DFP-ase" aktiven Gewebsextrakten des Kaninchens nachweisen , daß die Hydrolyse des DFP enzymatischen Ursprungs sein muß . Er zeigte nämlich , daß die Erhitzung des Gewebsextraktes auf 60°C zu einer Verminderung der Hydrolyseaktivität führte . Außerdem verursachte eine Dialyse keinen Aktivitätsverlust . Schließlich wurde die Aktivität durch Enzyminhibitoren wie Hg^{++} deutlich gesenkt . Der Gewebsextrakt besaß also

typische Enzymeigenschaften .

Damit galt die Existenz einer "DFP-ase" als gesichert . MAZUR (1946) untersuchte weiterhin , ob außer in Gewebsextrakten auch in Seren eine "DFP-ase" existierte . In den von ihm untersuchten Seren des Kaninchens und des Menschen fand er jeweils ein DFP-spaltendes Enzym .

Die ersten Enzympräparationen waren noch stark verunreinigt . Erst MOUNTER et al. (1953b) gelang es aus Schweinenierenhomogenat , ein hochgradig gereinigtes Enzym mit "DFP-ase"-Eigenschaften herzustellen , die sogenannte A-2-Fraktion . COHEN et al. (1957) erarbeiteten schließlich ein noch aktiveres Enzympräparat , die sogenannte B-Präparation .

Mit diesen beiden Enzympräparationen wurden systematische Untersuchungen bezüglich der Substratspezifität der "DFP-asen" durchgeführt (COHEN et al. 1957 , MOUNTER 1963 , MOUNTER et al. 1953b , 1956) . Dabei zeigte es sich , daß die Hydrolyse fast aller organischer Phosphorsäureester von der "DFP-ase" aktiviert werden kann . Keine Aktivierung wiesen lediglich die Trialkylphosphatverbindungen auf .

Da die Enzympräparationen jeweils aus Schweinenieren stammten , dürfen die Ergebnisse dieser Untersuchung allerdings nicht ohne weiteres auf "DFP-asen" anderer Herkunft übertragen werden !

So wird E 600 (Paraoxon) von Schweinenieren-"DFP-ase" nicht hydrolysiert , wohl aber von der aus Kaninchen-serum (MOUNTER 1954) .

Weiterhin wurde entdeckt , daß bestimmte Metallionen und Aminosäuren hemmende oder aktivierende Wirkung auf die "DFP-ase" ausüben (MOUNTER et al. 1953a , 1953b , MOUNTER et al. 1954) .

NEURATH (1965) schließlich gelang der Nachweis , daß die "DFP-ase" und das Hämolsin der Sendai- und New Castle Disease (NCD) - Viren identisch sind .

ALDRIDGE (1953a) stellte fest , daß zwei Typen von Esterasen existieren , die sich bezüglich ihrer Hemmbarkeit durch E 600 unterscheiden . Er nannte die Esterase , die durch E 600 (Paraoxon) nicht gehemmt wurde , A-Esterase . Diejenige , die durch E 600 gehemmt wurde , bezeichnete er als B-Esterase . Weiterhin konnte ALDRIDGE (1953b) nachweisen , daß das E 600 spaltende Enzym , die Paraoxonase (E.C.3.1.1.2.) , und die A-Esterase identisch sind . Er definierte daraufhin die A-Esterase als ein Enzym , das in der Lage ist E 600 zu hydrolysieren und nicht von ihm gehemmt wird .

Wie aber oben erwähnt , wird Paraoxon auch von der aus Kaninchenserum gewonnenen "DFP-ase" hydrolysiert (MOUNTER 1954) . Daraus folgt , daß die "DFP-ase" des Kaninchensерums eine A-Esterase darstellt .

A-Esterasen wurden beim Menschen und bei 10 Tierarten gefunden (ALDRIDGE 1953a) .

Die A-Esterase ist also ein Enzym , das von E 600 nicht gehemmt wird und in der Lage ist dieses zu hydrolysieren . Beim Kaninchenserum ist sie zudem in der Lage DFP zu hydrolysieren ; sie stellt somit also eine "DFP-ase" dar .

Hieraus darf aber nicht geschlossen werden , alle "DFP-asen" seien A-Esterasen oder umgekehrt !

So kann z.B. die "DFP-ase" der Schweineleiere Paraoxon nicht hydrolysieren , ist somit keine A-Esterase .

Weiterhin sind nicht alle Enzyme , die Paraoxon hydrolysieren auch gleichzeitig "DFP-asen" (MOUNTER 1963) .

"DFP-asen" wurden in fast allen lebenden Organismen gefunden : z.B. in Viren (NEURATH 1965) , Bakterien (MOUNTER et al. 1953a , WÄHLBY 1968 , WÄHLBY et al. 1966 , 1968) und Säugetieren (ALDRIDGE 1953a , 1953b , MOUNTER 1955 , MOUNTER et al. 1955b) .

In der Leber findet sich bei den Säugetieren , sowie beim Menschen , die größte Menge an "DFP-ase" . Aber auch in den übrigen Geweben ist die "DFP-ase" nachweisbar : Nebenniere , Milz , Gehirn , Herz , Lunge , Muskeln , Gonaden , Knochenmark , Pankreas und Thymus (MOUNTER et al. 1955b) .

Das Vorhandensein einer "DFP-ase" im Kaninchenserum (MAZUR 1946 , MOUNTER 1954) und im Hundeserum (KOELLE et al. 1946) gilt als gesichert . Allerdings dürfen - wie schon erwähnt - die Ergebnisse von einer Spezies nicht ohne Vorbehalt auf andere übertragen werden !

Über die Existenz einer "DFP-ase" im menschlichen Serum gibt bisher nur eine einzige Arbeit Auskunft (MAZUR 1946) . Er konnte eine menschliche Serum-"DFP-ase" mit einer WARBURG-Apparatur messen .

Hierbei betrug die Konzentration der "DFP-ase" nur 10% derjenigen , die für Kaninchenserum (MAZUR 1946 , MOUNTER 1954) ermittelt wurde .

Da das Ergebnis bis heute noch nie wieder überprüft wurde , steht somit der endgültige Beweis für die Existenz einer "DFP-ase" im menschlichen Serum noch aus !

II. Problemstellung

Wie aus der vorangegangenen Einleitung zu ersehen ist , wurde DFP schon recht gut untersucht . Auch die Existenz einer "DFP-ase" im allgemeinen scheint als gesichert zu gelten . Lediglich das Vorhandensein einer menschlichen Serum-"DFP-ase" ist bisher noch nicht als endgültig bewiesen anzusehen .

Am Institut für Gerichtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg haben schon früher Gruppen über DFP gearbeitet (siehe zusammenfassende Darstellung von HARLANDER 1981) . Sie vergifteten die Pseudocholinesterase (E.C.3.1.1.8.) des menschlichen Serums mit DFP und ermittelten die Ausgangsaktivitäten der unvergifteten Enzyme , sowie die Restaktivitäten der vergifteten Enzyme (Prinzip der sogenannten Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-VON MALLINCKRODT et al. 1969) .

Bei meinen Untersuchungen verfuhr ich ebenso . Einzig die DFP-Konzentrationen sind unterschiedlich . Bei meinen Messungen wurde die Serum-ChE nicht so stark vergiftet wie in den Arbeiten zuvor .

Meine Aufgabe besteht nun darin , die eigenen Ergebnisse mit denen zu vergleichen , die von zwei anderen Arbeitsgruppen (SWOBODA 1981) gewonnen wurden .

III. Experimentelle Untersuchung

Aufgabe der experimentellen Untersuchungen war es , im menschlichen Serum die Ausgangsaktivität der unvergifteten Pseudocholinesterase (E.C.3.1.1.8.) , ChE , und die Restaktivität des mittels DFP vergifteten Enzyms zu messen (Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-VON MALLINCKRODT et al. 1969) .

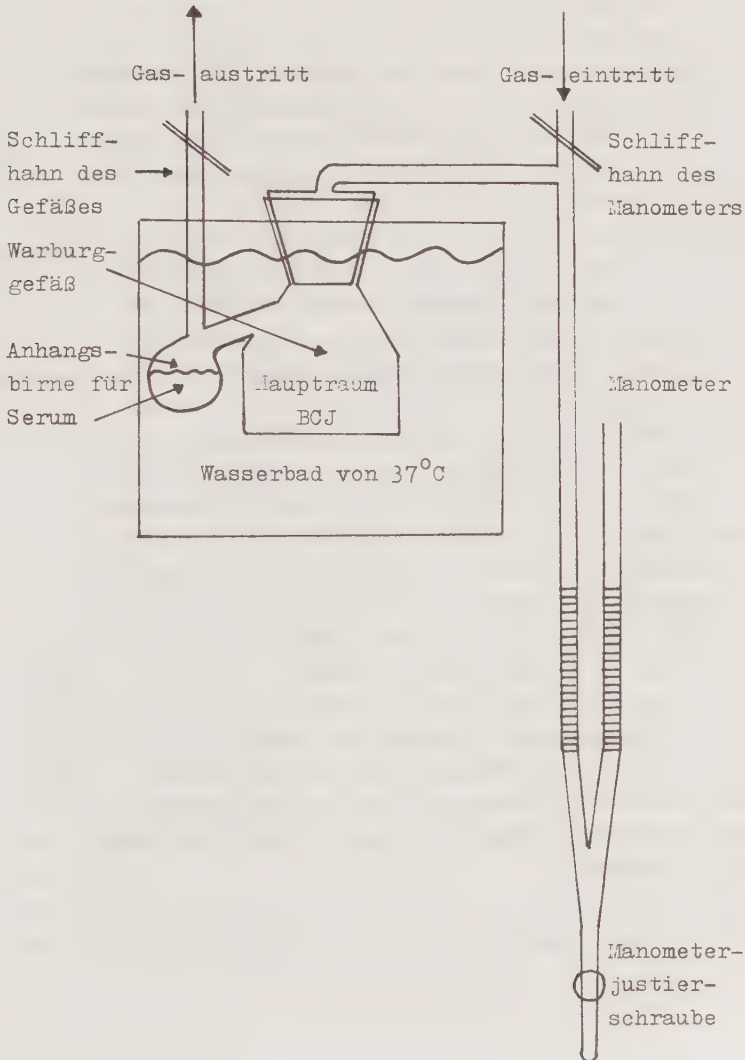
1. Gewinnung des Serums

Als Probanden standen 80 gesunde , bis auf wenige Ausnahmen nicht verwandte Personen im Alter zwischen 15 und 70 Jahren zur Verfügung . Sie waren genau zur Hälfte weiblichen und männlichen Geschlechts , und setzten sich zusammen aus Blutspendern der Universität Erlangen-Mürnberg und aus eigenen Bekannten . Ihnen wurden 10 ml Venenblut entnommen , das so schnell wie möglich 10 min bei 1600 U/min zentrifugiert wurde . Dabei kam es zu keiner erkennbaren Hämolyse . Nach dem Zentrifugieren wurde das Blut bei 5°C im Kühlschrank aufbewahrt . Spätestens nach 3 Tagen erfolgte dann die Entnahme des Serumüberstandes für die Versuchsdurchführung .

2. Beschreibung des angewandten Meßverfahrens

Man verfuhr entsprechend der Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-VON MALLINCKRODT et al. 1969 . Hierbei wird für dasselbe Serum sowohl die Aktivität der unvergifteten Serumcholinesterase (= Ausgangsaktivität) , als auch diejenige des mit DFP inkubierten Enzyms (= Restaktivität) ermittelt . Die Cholinesteraserestaktivität wird dann zu Untersuchungszwecken meist in % der Ausgangsaktivität ausgedrückt . Die Serum-Cholinesteraseaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun , Mel-

Abb. 6 : Schematische Darstellung einer der 14
Meßeinheiten der Warburg-Apparatur



sungen , nach der manometrischen Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958) bestimmt .

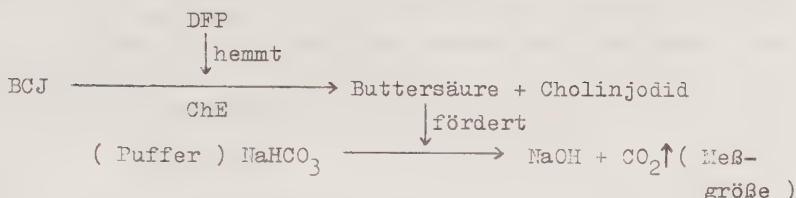
Die verwendete Warburg-Apparatur hat 14 Meßeinheiten , die in einem geheiztem Wasserbad stehen . Die Temperatur des Wasserbades wird mit Hilfe eines Thermostats konstant auf 37°C gehalten . Zudem werden alle 14 Meßeinheiten ständig durch einen Motor in dem Wasserbad hin und her bewegt (Schüttelfrequenz 100/min) , um für alle 14 Elemente eine einheitliche Versuchstemperatur zu gewährleisten , sowie für eine gute Durchmischung der Ansätze zu sorgen . Über ein Schlauchsystem kann an alle 14 Meßeinheiten ein Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% N₂ angeschlossen werden .

Zur Verdeutlichung ist in Abb. 6 eine der 14 Meßeinheiten der Warburg-Apparatur wiedergegeben .

Als Substrat für die Serum-ChE diente Butyrylcholinjodid (BCJ) . Dieses ist ein spezifisches Substrat , das zwar rasch von der nicht zellständigen Pseudocholinesterase des Serums (E.C.3.1.1.8.) abgebaut wird , nicht jedoch von der zellständigen Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7.) der Erythrozyten . Dadurch werden Aktivitäten anderer Enzyme , speziell der AChE , ausgeschlossen und spezifische enzymatische Tests im Serum möglich . Das hat z.B. den Vorteil , daß in einem Serum , obwohl hämolytisch geworden , trotzdem gemessen werden kann , da das BCJ nur mit der ChE des Serums , nicht aber mit der AChE der Erythrozyten reagiert .

Wie nun CO₂ , die Meßgröße , bei der Reaktion des BCJ mit der ChE frei wird , zeigt Abb. 7 .

Abb. 7 : Reaktion von BCJ mit der ChE und die Wirkung des DFP



3. Inkubationsbedingungen für DFP

Für die Vergiftung des Enzyms wurden 1 μl DFP auf 110 ml Aqua bidest. gegeben und 10 Minuten lang mechanisch geschüttelt . 1 μl dieser Lösung wurde dann in 30 ml Verdünnungslösung gegeben und ebenfalls 10 Minuten lang mechanisch geschüttelt . Die Verdünnungslösung bestand aus 10 Teilen 0,9% iger NaCl-Lösung und 3 Teilen 1,2% iger NaHCO₃-Lösung . Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,15 ml DFP-haltiger Verdünnungslösung im Reagenzglas versetzt . Die DFP-Konzentration dieses Inkubationsansatzes betrug $1,57 \times 10^{-9}$ Mol/l (c = $1,57 \times 10^{-9}$ molar) . Analog wurde bei den unvergifteten Ansätzen 0,15 ml Serum mit 1,15 ml "normaler" , d.h. nicht DFP enthaltender Verdünnungslösung ebenfalls im Reagenzglas versetzt . Von diesen Inkubationsansätzen wurden jeweils 0,5 ml in die entsprechenden Anhangsbirnen der Warburg-Gefäße pipettiert . In den Hauptraum wurden 1.5 ml einer 0,546% igen wäßrigen Butyrylcholinjodid - Lösung gegeben . Die so gefüllten Warburg-Gefäße wurden an den Manometern angeschlossen , in ein Wasserbad von 37°C gebracht und mechanisch geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min) .

Nach 30 Minuten wurde die Warburg-Apparatur unter weiterem Schütteln mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 und 95% N_2 25 Minuten lang begast . Danach wurden die Begasungsschläuche entfernt und die Gefäßhähne geschlossen . Damit war eine Gesamtinkubationszeit von etwa 60 Minuten erreicht .

Der pH-Wert lag während der Inkubation etwa bei 7,7 (SÜLLMANN 1964) .

4. Messung der ChE-Aktivitäten

Nach beendeter Inkubation wurden die verdünnten Seren aus der Anhangsbirne in den Hauptraum des Warburg-Gefäßes gekippt und jeweils 15 Sekunden lang einzeln mit der Hand gemischt . Der pH lag nun bei 7,2 (SÜLLMANN 1964) . Bei 14 Warburg-Gefäßen ergibt sich somit eine Mischzeit von 3,5 Minuten . Nach dieser Zeit wurden die Manometerstände auf den so genau wie möglich justierten Manometern abgelesen (Vordifferenz) und die Manometerhähne geschlossen .

Dann wurden die Manometerstände nach 15 und nach 30 Minuten abgelesen . Hierbei blieb die Schüttelfrequenz von 100/min bis auf die kurzen Unterbrechungen während des Ablesens ständig erhalten .

Um exaktere Ergebnisse zu erhalten , wurden für jedes Serum Doppelbestimmungen durchgeführt . Pro Proband wurden also je zwei Ansätze , die nicht mit DFP inkubiert waren , und je zwei , die mit DFP inkubiert waren , gemessen .

Um die Eigenhydrolyse des Substrats zu berücksichtigen , wurden bei jedem Versuchslauf 2 Leerwerte mitgeführt . Diese Leerwerte enthielten im Hauptraum des Warburg-Gefäßes ebenfalls 1,5 ml BCJ-Lösung , in der Anhangsbirne jedoch statt des Serums lediglich Verdünnungslösung ohne DFP .

Von den 30 Minuten-Werten wurden schließlich die entsprechenden Vordifferenzen subtrahiert . Diese Werte wurden dann mit den für jedes Warburg-Gefäß charakteristischen Konstanten multipliziert . Diese Gefäßkonstanten errechnen sich nach der in Abb. 8 dargestellten Formel (SÜLLMANN 1964) .

Abb. 8 : Formel für die Gefäßkonstanten nach
SÜLLMANN 1964

$$K = \frac{V_G \times \frac{273}{T} + V_F \times a}{P_0}$$

Hierbei gilt :

V_G = Gasraumvolumen

T = Versuchstemperatur

V_F = Flüssigkeitsvolumen

a = Absorptionskoeffizient

P_0 = Normaldruck

Zuletzt wurde das arithmetische Mittel aus den zueinandergehörigen Wertepaaren der Doppelansätze gebildet und hiervon der Mittelwert des Leerwertpaares subtrahiert .

Damit ergab sich für jeden Probanden ein Wert für das unvergiftete Serum (Ausgangsaktivität) und ein Wert für das vergiftete Serum (Restaktivität) . Die Angabe dieser Aktivitäten erfolgte in $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ und 0,15 ml Serum . Will man die Restaktivität dann noch in % der Ausgangsaktivität ausdrücken , so wird die Restaktivität durch die Ausgangsaktivität dividiert und mit 100 multipliziert .

5. Präzisionsmessung und Richtigkeitskontrollen

Wegen der vielen möglichen Fehlerquellen bei der Versuchsdurchführung , vor allem beim Pipettieren der sehr kleinen Giftmengen ($2 \times 1 \mu\text{l}$!) , war es notwendig , die Genauigkeit zu überprüfen .

Zur Ermittlung der Präzision wurden 12 Messungen mit demselben Serum durchgeführt und jeweils die Restaktivität in % der Ausgangsaktivität errechnet . Aus den 12 Restaktivitäten ergab sich eine Standardabweichung von $s = 1,8593$. Bei einem Mittelwert von $\bar{x} = 82,1125$ Restaktivität % führt das zu einem Variationskoeffizienten von $v = 0,0226$ oder in Prozent ausgedrückt $V = 2,26\%$. Da bei klinisch-chemischen Untersuchungsmethoden mit Enzymen V kleiner als 10% sein muß , dürfen die Ergebnisse als präzise gelten .

Für die Richtigkeitskontrolle standen Werte von Kontrollpersonen zur Verfügung , die bereits früher am Institut für Gerichtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg ermittelt wurden . Für diese Kontrollpersonen wurden jetzt von mir neue Werte bestimmt und mit den früher gewonnenen verglichen . Dabei stimmten die Werte sämtlicher Personen überein . Außerdem wurde etwa zur Hälfte des gesamten Meßzeitraumes ein Kontrollversuch mit einem schon bekannten Serum durchgeführt . Hierbei ergab sich ebenfalls keine Abweichung vom alten Wert .

6. DFP-Konzentration

Wie bereits erwähnt , gab ich $1 \mu\text{l}$ DFP , der $5,76657 \times 10^{-6}$ Mol enthält , in 110 ml Aqua bidest. . Hierin befanden sich somit ebenfalls $5,76657 \times 10^{-6}$ Mol DFP . $1 \mu\text{l}$ dieser 1. Verdünnung wurde in 30 ml

Verdünnungslösung (Puffer) gegeben . Diese Lösung
enthielt jetzt $5,24228 \times 10^{-11}$ Mol DFP . 1,35 ml
dieser 2.Verdünnung wurden zu 0,1> ml Serum pipettiert .
Der Inkubationsansatz enthielt somit $2,35894 \times 10^{-12}$
Mol DFP . Das ergibt eine DFP-Konzentration im Inku-
bationsansatz von $c = 1,57 \times 10^{-9}$ Mol/l .

IV. Untersuchungsergebnisse

In der folgenden Tabelle I sind meine an 80 Probanden gemessenen Ausgangs- und Restaktivitäten der Serum-ChE nach Vergiftung mit DFP aufgeführt .

Für die Tabelle gelten dabei folgende Abkürzungen :

AA = Ausgangsaktivität der Serum-ChE in $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$

RA = Restaktivität der Serum-ChE in $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$

RA% = Restaktivität in % der Ausgangsaktivität

m = männlich

w = weiblich

Die Altersangabe erfolgte in vollendeten Jahren zur Zeit der Messung .

Tabelle I : Ausgangs- und Restaktivitäten der Serum-ChE nach Vergiftung mit DFP
($c = 1,57 \times 10^{-9}$ molar) geordnet nach steigenden Restaktivitäten in % der Ausgangsaktivitäten

Proband	Alter	Ge- schlecht	AA in $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$	RA	RA%
Löffler, Ingolf	26	m	224,31	89,23	39,78
Riehl, Marianne	25	w	218,82	101,86	46,78
Klotz, Marianne	31	w	108,43	52,20	48,56
Beyer, Elke	18	w	238,72	119,21	49,94
Sperlein, Ludwig		m	133,63	69,74	52,19
Röder, Kurt	30	m	225,86	128,23	56,77
Sparing, Roland	40	m	108,07	62,28	57,63
Kaiser, Hedwig	24	w	143,81	84,46	58,73
Häfner, Ulrich	23	m	186,44	110,40	59,21
Watzlawczik, Brigitte	20	w	207,73	124,12	59,75
Raeder, Josef	31	m	258,82	155,50	60,08

Proband	Alter	Ge- schlecht	AA µl CO ₂	RA in 30min	RA%
Fischer, Ortwin	40	m	212,91	131,16	61,60
Reuß, Eva-Maria	23	w	118,83	73,48	61,84
Hanusz, Barbara		w	114,81	73,10	63,67
Bastanci-Dahlem, W.	39	w	151,69	98,79	65,13
Schörshusen, Wiete	33	w	168,22	110,10	65,45
Steinhäuser, Manfred	28	m	207,91	136,51	65,68
Kahnt, Michael	23	m	180,00	118,43	65,79
Partheymüller, Hedwig	52	w	197,58	132,02	66,82
Reimer, Gerd		m	256,34	173,64	66,96
Sucker, Charlotte	50	w	181,40	122,89	67,75
Becher, Helmut	23	m	194,86	132,16	67,82
Welder, Michael	35	m	201,63	137,30	68,10
Merklein,		m	189,23	128,90	68,12
Kohl, Rudolf	38	m	204,23	139,37	68,24
Güttler, Christine	40	w	182,65	126,58	68,31
Heigl, Walter	33	m	197,57	137,02	69,35
Engmann, Jörg	22	m	159,86	111,37	69,67
Dlugosch, Elisabeth		w	177,18	123,49	69,70
Hutzler, Elisabeth	30	w	148,87	103,90	69,79
Gäffler, Christine	40	w	169,94	119,88	70,54
Stock, Hans	51	m	247,99	175,38	70,72
Vogel, Susanne	22	w	216,54	154,47	71,34
Lochner, Ferdinand	25	m	147,96	106,21	71,78
Baßler, Lutz	25	m	192,05	137,94	71,83
Himmer, Oskar		m	206,50	148,46	71,89
Henning, Gabriele	23	w	176,63	127,06	71,94
Flesch, Torsten	18	m	160,52	116,11	72,33
Thiel, Willi	51	m	189,76	138,94	73,75
Körner, Helene	36	w	222,97	164,80	73,94
Glenk, Dieter	23	m	253,33	187,55	74,03

Proband	Alter	Ge- schlecht	AA in µl CO ₂ /30min	RA	RA%
Junek-Enzian, Teresa	23	w	144,95	107,32	74,04
Bauer, Brigitte	35	w	206,45	154,37	74,77
Popp, Gerlinde	40	w	202,15	153,93	75,16
Weiß, Karl-Friedrich	28	m	189,88	142,76	75,18
Fiebig, Gunhild	26	w	156,84	118,51	75,56
Holder, Beate	20	w	167,12	127,09	76,05
Reichenberger, Margit	49	w	215,92	164,27	76,08
Schwalb, Hans		m	239,10	181,89	76,08
Froneberg, Gabriele		w	175,86	133,82	76,09
Stadter, Josef	44	m	202,23	153,94	76,12
Bädorf, Ursula		w	199,36	153,76	77,13
Sperlein, Marianne		w	163,52	127,17	77,30
Bauer, Iris	15	w	179,45	138,91	77,41
Thomas, Andreas	19	m	220,18	172,57	78,38
Hacker, Ingrid	37	w	158,99	124,66	78,41
Röder, Hannelore	29	w	183,19	143,09	78,54
Wust, Irmgard	23	w	173,25	136,53	78,81
Bankuti, Angelika	19	w	184,58	145,75	78,96
Kim-Berger, Heasook	29	w	157,15	125,48	79,21
Dimaczek, Roland	22	m	205,67	164,16	79,82
Tetens, Siegfried	23	m	189,90	160,64	80,76
Schuster, Berta	53	w	195,13	158,23	81,09
Jahn, Hannelore	44	w	172,73	140,32	81,24
Schneiderbanger, R.	29	m	212,54	173,78	81,76
Hermann, Karl	38	m	249,06	204,74	82,21
Piehl, Hannelore	31	w	188,66	156,25	82,82
Theiler, Hans-K.	33	m	245,75	208,48	84,83
Geldmacher, Herbert		m	270,88	230,77	85,19
Dittrich, Heike		w	191,11	163,65	85,63
Jahn, Thomas	23	m	243,84	210,57	86,36

Proband	Alter	Ge- schlecht	AA in µl CO ₂ /30min	RA	RA%
Dellner, Adolf	56	m	274,64	237,84	86,60
Ottenschläger, Anna		w	248,08	216,70	87,35
Schimmer, Ernst		m	226,30	198,70	87,80
Jahn, Rosa	70	w	258,37	230,83	89,34
Sucker, Ralph	25	m	250,19	224,63	89,78
Ringer, Richard	43	m	237,63	216,84	91,25
Schorr, Friedrich		m	200,99	183,52	91,31
Thieme, Werner	45	m	176,78	161,94	91,61
Jahn, Petra	15	w	242,28	222,20	91,71

V. Auswertung

Um die Untersuchungsergebnisse exakt auswerten und mit anderen Arbeiten (SWOBODA 1981) vergleichen zu können , wurden die Daten der Tabelle I auf Lochkarten übertragen . Die statistische Auswertung dieser Daten erfolgte an der Rechenanlage TR 440 des Regionalen Rechenzentrums Erlangen unter Zuhilfenahme des Programmsystems STATSYS (VICTOR et al. 1973) . Das Resultat der statistischen Auswertung meiner Meßergebnisse ist in diesem Abschnitt der Arbeit wiedergegeben .

Zunächst soll die Häufigkeitsverteilung bezogen auf die Restaktivität in % der Ausgangsaktivität dargestellt werden . Hierzu dient das Histogramm der Abb. 9 .

Aus mathematischen Gründen wird anstelle der Restaktivität in % der Ausgangsaktivität auch gern der logit Restaktivität aufgetragen . Hierdurch wird außerdem häufig eine bessere Annäherung an die Normalverteilung erzielt . Den logit Restaktivität erhält man , indem man setzt :

$$\text{logit RA} = \ln \frac{\text{RA}\%}{100 - \text{RA}\%} = \ln \frac{\text{RA}}{\text{AA} - \text{RA}} = \ln \frac{\text{RA}}{\text{Senkung}}$$

Hierbei bedeutet wieder :

AA = Ausgangsaktivität in $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$

RA = Restaktivität in $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$

RA% = Restaktivität in % der Ausgangsaktivität

Senkung = Differenz aus Ausgangsaktivität und Restaktivität

Die Häufigkeitsverteilung bezogen auf den logit RA wird in dem Histogramm der Abb. 10 dargestellt .

Abb. 9 : Histogramm der RA%-Werte der Serum-ChE gemessen an 80 Probanden ($c_{DFP} = 1,57 \times 10^{-9}$ molar)
- Ergebnisse von Tabelle I -

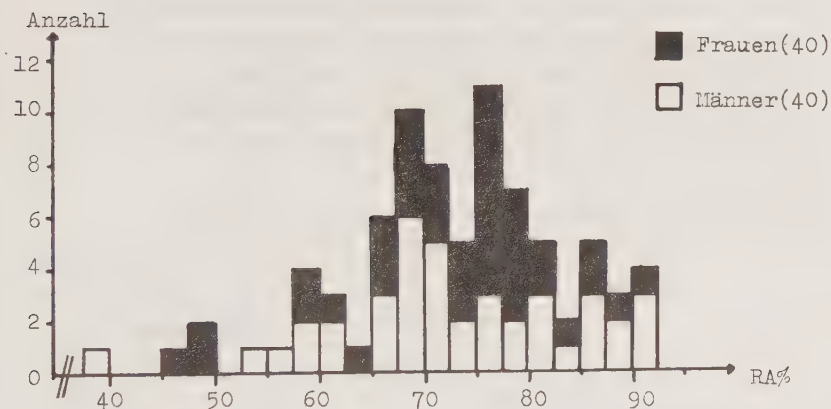
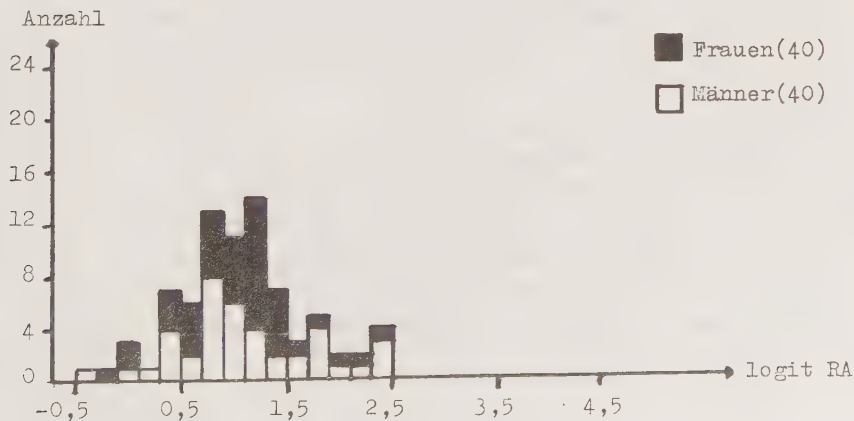


Abb. 10 : Histogramm der logit RA-Werte von 80 Probanden ($c_{DFP} = 1,57 \times 10^{-9}$ molar)
- Ergebnisse von Tabelle I -



Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Verteilungen der Meßergebnisse entsprechend dem Vergiftungsgrad der Serum-ChE .

Auffallend ist lediglich , daß bei den Frauen niedrige Werte der RA% bzw. des logit RA häufiger vorkommen als bei den Männern . Das macht auch ein Vergleich der Mittelwerte von RA% und logit RA deutlich . Eine Zusammenstellung dieser Mittelwerte mit Angabe des Konfidenzbereiches für $P = 0,05$ getrennt nach Geschlecht findet sich in der Tabelle II .

Tabelle II : Mittelwerte von RA% und logit RA mit Konfidenzbereich für $P = 0,05$ getrennt nach Geschlecht

	Mittelwert RA%			Mittelwert logit RA		
	alle	♀	♂	alle	♀	♂
Eigenes Kollektiv	72,89	72,57	73,20	1,06	1,03	1,09
(40♀,40♂,80 gesamt)	$\pm 2,44$	$\pm 3,30$	$\pm 3,72$	$\pm 0,13$	$\pm 0,17$	$\pm 0,21$

Daraus ist zu ersehen , daß die Serum-ChE der Frauen bei gleicher DFP-Konzentration stärker vergiftet werden kann als die der Männer . Bei meinem Kollektiv sind die Unterschiede allerdings nicht signifikant .

Interessant erscheint nun die Frage , ob zwischen den Ausgangs- und Restaktivitäten eine Korrelation besteht . Hierzu sind die Ergebnisse der Tabelle I in der Abb. 11 wiedergegeben . Statt der vielfach üblichen Praxis , die Ausgangsaktivität (AA) auf die Ordinate aufzutragen , wurde hier bewußt die AA als Abszisse gewählt : Im allgemeinen wird nämlich

die unabhängige Variable - hier die AA - stets auf die Abszisse , die abhängige Variable - hier die RA - stets auf die Ordinate aufgetragen .

Die Korrelationskoeffizienten für das Diagramm der Abb. 11 finden sich in der Tabelle III .

Abb. 11 : Diagramm der Korrelation zwischen Ausgangs-
(AA) und Restaktivität (RA) bei 80
Probanden ($c_{\text{DFP}} = 1,57 \times 10^{-9}$ molar)
- Ergebnisse von Tabelle I -

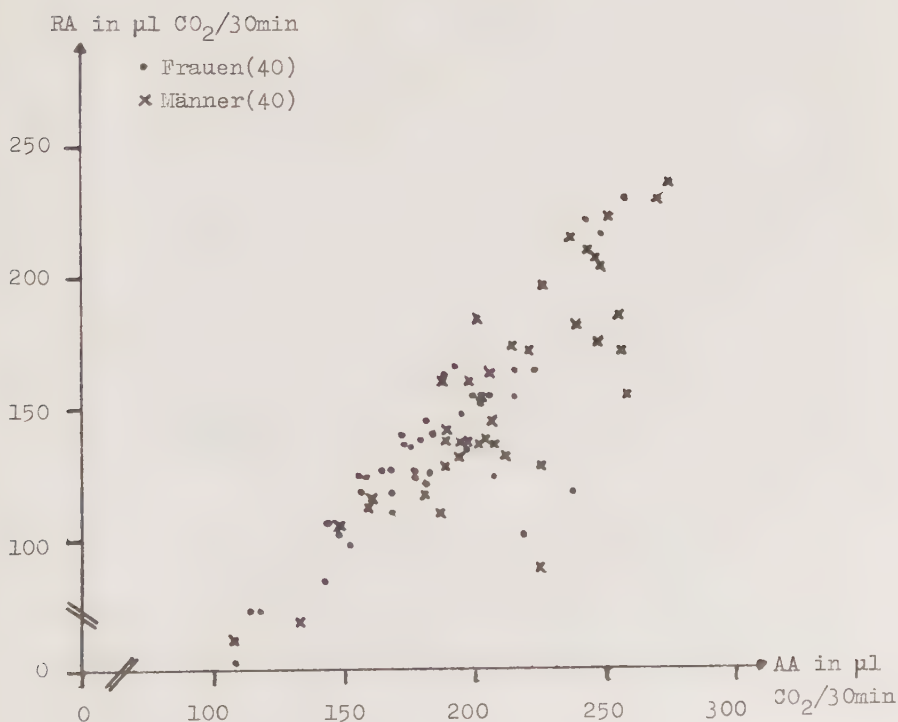


Tabelle III : Korrelationskoeffizienten r für die
Beziehung Ausgangs- zu Restaktivität
für mein Kollektiv

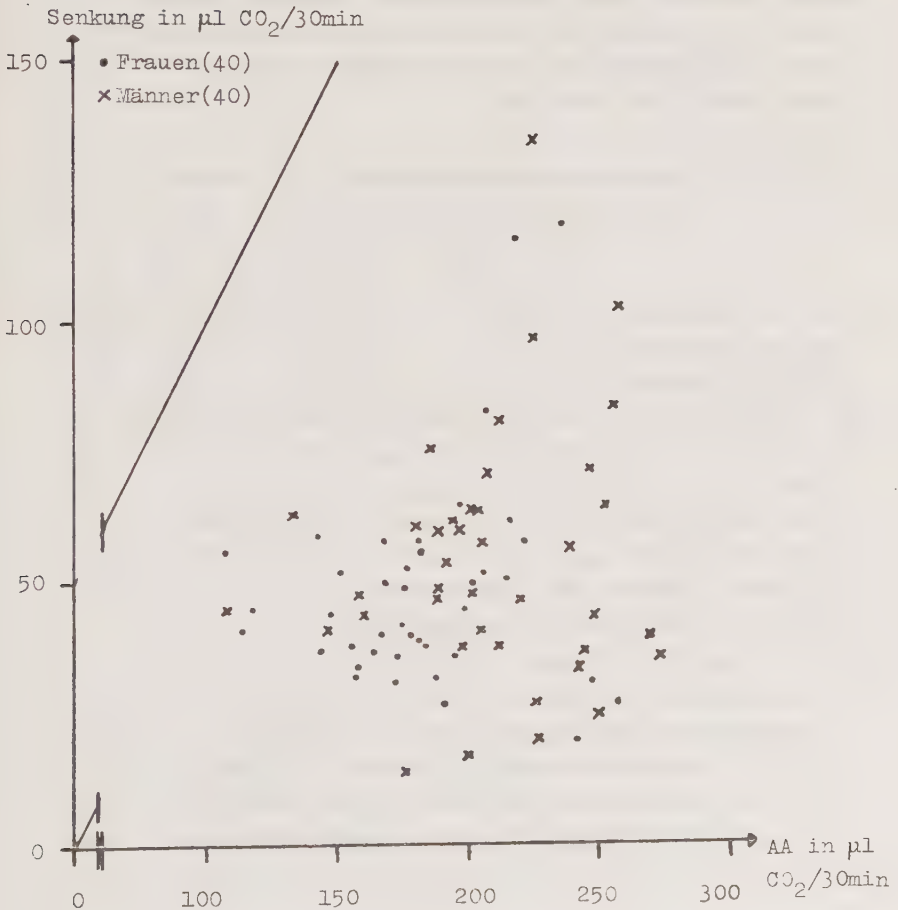
	Korrelationskoeffizienten		
	r_{gesamt}	r_{Frauen}	$r_{\text{Männer}}$
Eigenes Kollektiv (40♀, 40♂, 80 gesamt)	0,8426	0,8387	0,8255

Bei der Betrachtung der graphischen Darstellung (Abb. 11) und der errechneten Korrelationskoeffizienten (Tabelle III) zeigt sich deutlich eine hoch signifikante Korrelation zwischen Ausgangs- und Restaktivität unabhängig vom Geschlecht . Anders ausgedrückt bedeutet das : Probanden mit hohen Ausgangsaktivitäten besitzen auch hohe Restaktivitäten ; und umgekehrt , Probanden mit niedrigen Ausgangsaktivitäten besitzen niedrige Restaktivitäten .

Um Aufschluß darüber zu erzielen , ob DFP im menschlichen Serum einem enzymatischen Abbau unterliegt , oder ob eine Titration mit DFP stattfindet , ist es sinnvoll , die Ausgangsaktivität in Abhängigkeit von der Senkung darzustellen . Unter Senkung versteht man , wie bereits erwähnt , die Differenz aus Ausgangs- und Restaktivität . In der Abb. 12 sind die Ausgangsaktivitäten und die Senkungen meines Probandenkollektivs eingetragen .

Da es aus technischen Gründen nicht möglich ist , jeweils gleiche Grenzen auf den Achsen zu wählen , wurde zur Verdeutlichung eine "Null-Gerade" in das Diagramm eingezeichnet . Diese "Null-Gerade" entspricht mathematisch der Menge aller Punkte , für die gilt :

Abb. 12 : Diagramm der Korrelation zwischen Ausgangs-
aktivität und Senkung bei 80 Probanden
($c_{\text{DFP}} = 1,57 \times 10^{-9}$ molar)
- Ergebnisse von Tabelle I -



Ausgangsaktivität = Senkung , also Restaktivität = Null .
Würde man auf beiden Achsen jeweils den gleichen Maßstab wählen , so wäre die "Null-Gerade" gleichbedeutend mit einer 45° Achse im Koordinatensystem .

Auch für die Beziehung Ausgangsaktivität zu Senkung wurden die Korrelationskoeffizienten für mein Probandenkollektiv errechnet . Eine Zusammenstellung dieser Korrelationskoeffizienten getrennt nach Geschlecht findet sich in der Tabelle IV .

Tabelle IV : Korrelationskoeffizienten r für die Beziehung Ausgangsaktivität zu Senkung getrennt nach Geschlecht

	Korrelationskoeffizienten		
	r_{gesamt}	r_{Frauen}	$r_{\text{Männer}}$
Eigenes Kollektiv (40♀, 40♂, 80 gesamt)	0,1742	0,1942	0,0947

Bei der Betrachtung der graphischen Darstellung (Abb. 12) und der errechneten Korrelationskoeffizienten (Tabelle IV) zeigt sich folgendes :

Bei meinem Kollektiv der 80 Probanden mit der DFP-Konzentration von $c_{\text{DFP}} = 1,57 \times 10^{-9}$ molar findet sich keine signifikante Korrelation (für $P \leq 0,05$) zwischen Ausgangsaktivität und Senkung .

Damit stehen meine Ergebnisse im Widerspruch zu früher gewonnenen Ergebnissen (SWOBODA 1981) .

Es soll deshalb im folgenden Abschnitt VI meiner Arbeit ein Vergleich meiner mit diesen früheren Ergebnissen erfolgen und der Versuch einer Interpretation der auftretenden Unterschiede unternommen werden .

VI. Diskussion

Der Themastellung entsprechend soll die Arbeit einen Vergleich der Restaktivitäten der menschlichen Serum-ChE nach Vergiftung mit DFP in drei unterschiedlichen Konzentrationen liefern . Meine Aufgabe bestand nun darin , meine eigenen Ergebnisse , die ich mit einer DFP-Konzentration von $c_{\text{DFP}} = 1,57 \times 10^{-9}$ molar gewonnen hatte , mit früheren Gruppen (SWOBODA 1981) zu vergleichen , die mit anderen DFP-Konzentrationen gearbeitet hatten .

Die von mir zu Vergleichszwecken herangezogenen Gruppen benutzten zur Vergiftung der Serum-ChE dabei folgende DFP-Konzentrationen (SWOBODA 1981) :

Vergleichsgruppe I gab 1 μl DFP in 135 ml Aqua bidest. . 5 μl dieser Verdünnung wurden in 40 ml Verdünnungslösung (Puffer) gegeben . 1,35 ml dieser Lösung wurden zu 0,15 ml Serum pipettiert . Damit ergab sich eine DFP-Konzentration im Inkubationsansatz von $c_{\text{DFP}} = 4,80 \times 10^{-9}$ molar .

Vergleichsgruppe II gab 1 μl DFP in 110 ml Aqua bidest. . 5 μl dieser Verdünnung wurden in 40 ml Verdünnungslösung (Puffer) gegeben . 1,35 ml dieser Lösung wurden zu 0,15 ml Serum pipettiert . Damit ergab sich eine DFP-Konzentration im Inkubationsansatz von $c_{\text{DFP}} = 5,89 \times 10^{-9}$ molar .

Um nun meine Messungen mit denen der beiden Vergleichsgruppen (SWOBODA 1981) vergleichen zu können , wurden die Meßergebnisse der beiden Gruppen ebenfalls auf Lochkarten übertragen . Die statistische Auswertung dieser Meßdaten erfolgte , ebenso wie die meiner Daten , an der Rechenanlage TR 440 des Regionalen Rechenzentrums Erlangen unter Zuhilfenahme des Pro-

grammsystems STATSYS (VICTOR et al. 1973) und eines ad hoc für dieses Problem erstellten Programmes .

Das Resultat der statistischen Auswertung meiner Meß-
ergebnisse ist im Abschnitt V dieser Arbeit nachzu-
lesen .

Auf die statistische Auswertung der Vergleichsgruppen
I und II (SWOBODA 1981) soll im folgenden einge-
gangen werden .

Zunächst wurde auch bei SWOBODA (1981) die Häufig-
keitsverteilung bezogen auf die Restaktivität in %
der Ausgangsaktivität dargestellt . Hierzu dienen die
Histogramme der Abb. 13 und 15 .

Die Häufigkeitsverteilung bezogen auf den logit RA
zeigen die Histogramme der Abb. 14 und 16 .

Die Abb. 13 - 16 lassen die Verteilungen der Meßer-
gebnisse entsprechend der verschiedenen DFP-Konzen-
trationen erkennen .

Wie schon zuvor bei meinen Ergebnissen (vgl. Tabelle
II) fällt auch hier auf , daß bei den Frauen unab-
hängig von der DFP-Konzentration niedrigere Werte
der RA% bzw. des logit RA häufiger vorkommen als bei
den Männern . Ein Vergleich der Mittelwerte von RA%
und logit RA soll das verdeutlichen (Tabelle V) .
Während bei meinem Kollektiv keine signifikanten
Unterschiede auftraten (Tabelle II) , sind die
Unterschiede zwischen Frauen und Männern bei Ver-
gleichsgruppe I und II allerdings signifikant . Eine
Zusammenstellung der Mittelwerte von RA% und logit RA
getrennt nach Geschlecht mit Angabe des Konfidenzbe-
reiches für $P = 0,05$ gibt Tabelle V wieder .

Abb. 13 : Histogramm der RA%-Werte der Serum-ChE
gemessen an 151 Probanden (Vergleichsgruppe I)
($c_{\text{DFP}} = 4,80 \times 10^{-9}$ molar)

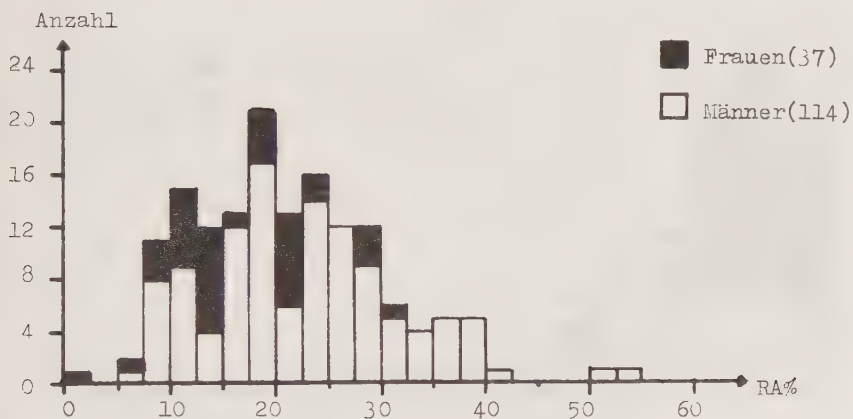


Abb. 14 : Histogramm der logit RA-Werte von
151 Probanden (Vergleichsgruppe I)
($c_{\text{DFP}} = 4,80 \times 10^{-9}$ molar)

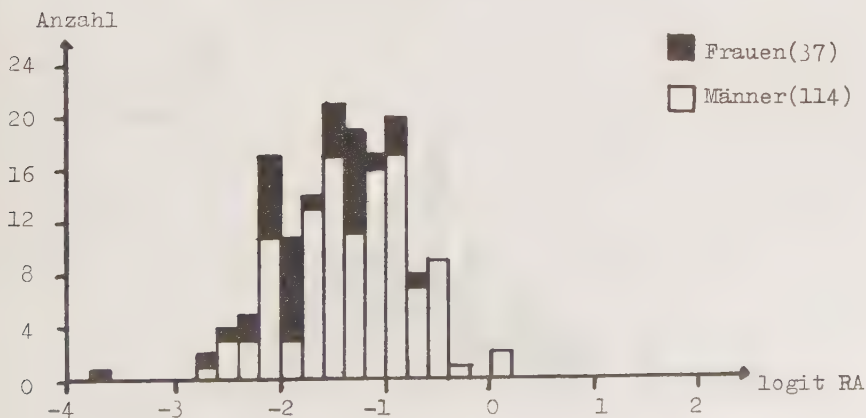


Abb. 15 : Histogramm der RA%-Werte der Serum-ChE gemessen an 150 Probanden (Vergleichsgruppe II)
($c_{\text{DFP}} = 5,89 \times 10^{-9}$ molar)

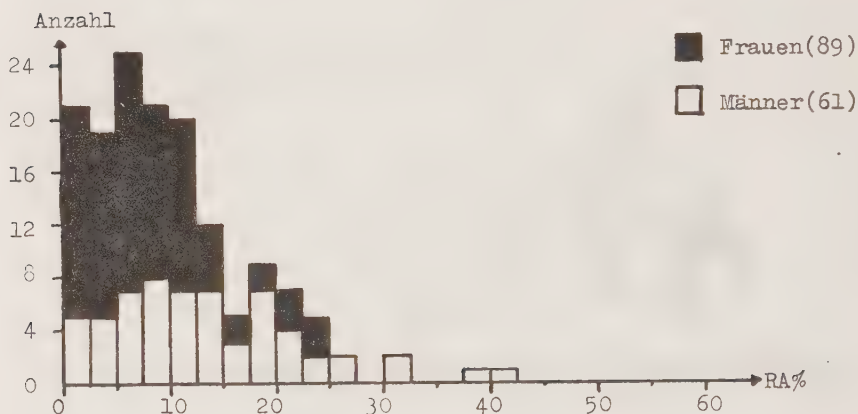


Abb. 16 : Histogramm der logit RA-Werte von 150 Probanden (Vergleichsgruppe II)
($c_{\text{DFP}} = 5,89 \times 10^{-9}$ molar)

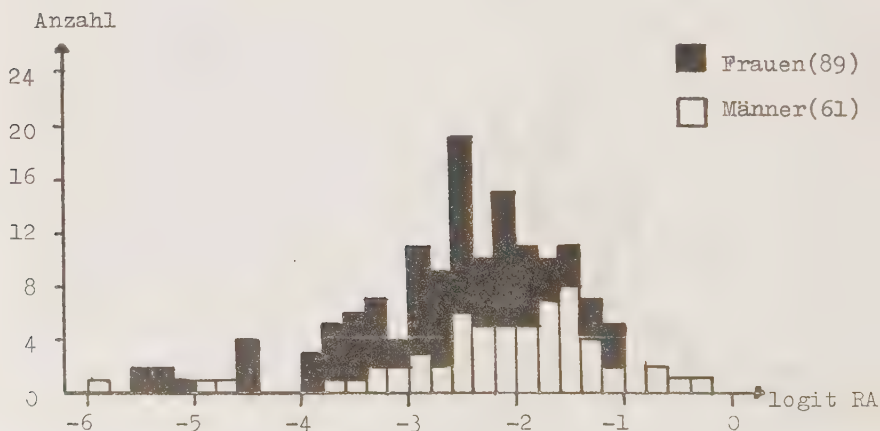


Tabelle V : Mittelwerte von RA% und logit RA mit
Konfidenzbereich für P = 0,05 getrennt
nach Geschlecht

	Mittelwert RA%			Mittelwert logit RA		
	alle	♀	♂	alle	♀	♂
Kollektiv von Vergleichsgruppe I (37♀,114♂,151 gesamt)	21,29 ±1,47	16,88 ±2,16	22,72 ±1,76	-1,09 ±0,09	-1,66 ±0,16	-1,00 ±0,10
Kollektiv von Vergleichsgruppe II (89♀,61♂,150 gesamt)	9,84 ±1,29	8,10 ±1,23	13,56 ±1,29	-2,55 ±0,18	-2,76 ±0,21	-2,13 ±0,26

Schließlich wurde noch die Korrelation zwischen Ausgangs- und Restaktivität untersucht (SWOBODA 1981) . Hierzu dienen die Diagramme der Abb. 17 und 18 . Die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten , wieder nach Geschlecht getrennt , finden sich in der folgenden Tabelle VI .

Tabelle VI : Korrelationskoeffizienten r für die
Beziehung Ausgangs- zu Restaktivität
getrennt nach Geschlecht

	Korrelationskoeffizienten		
	r _{gesamt}	r _{Frauen}	r _{Männer}
Vergleichsgruppe I (37♀,114♂,151 gesamt)	0,8556	0,7917	0,8906
Vergleichsgruppe II (89♀,61♂,150 gesamt)	0,7591	0,7287	0,7605

Abb. 17 : Diagramm der Korrelation zwischen Ausgangs-
(AA) und Restaktivitäten (RA) für die
151 Probanden der Vergleichsgruppe I
($c_{\text{DFP}} = 4,80 \times 10^{-9}$ molar)

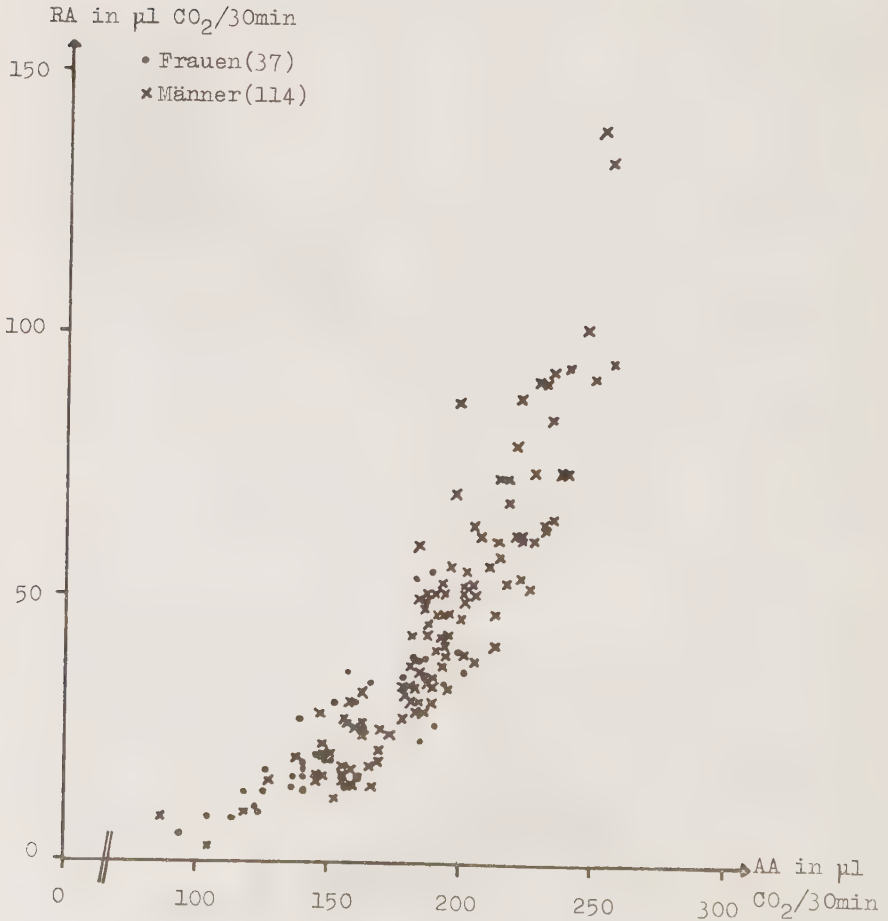
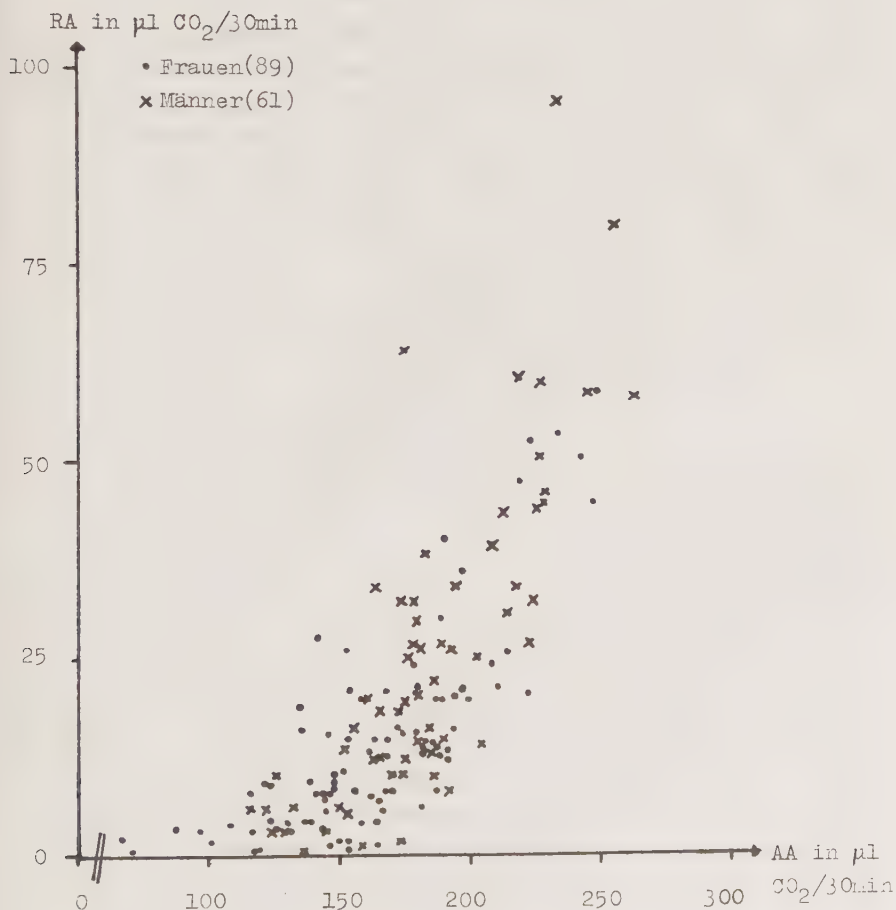


Abb. 18 : Diagramm der Korrelation zwischen Ausgangs-
(AA) und Restaktivitäten (RA) für die
150 Probanden der Vergleichsgruppe II
($c_{\text{DFP}} = 5,89 \times 10^{-9}$ molar)



Bei der Betrachtung der graphischen Darstellungen (Abb. 17 und 18) sowie der errechneten Korrelationskoeffizienten (Tabelle VI) zeigt sich - wie schon bei meinen Ergebnissen (Abb. 11 bzw. Tabelle IV) - deutlich eine hoch signifikante Korrelation zwischen Ausgangs- und Restaktivität unabhängig vom Geschlecht .

Zuletzt soll noch die Ausgangsaktivität in Abhängigkeit von der Senkung dargestellt werden . Dazu dienen die Abb. 19 und 20 . Auch hier wurde wieder die "Null-Gerade" in die Diagramme eingezeichnet . Da aus Platzgründen keine gleichen Maßstäbe auf den Achsen möglich sind , soll sie zur Orientierung dienen .

Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind der folgenden Tabelle VII zu entnehmen .

Tabelle VII : Korrelationskoeffizienten r für die Beziehung Ausgangsaktivität zu Senkung getrennt nach Geschlecht

	Korrelationskoeffizienten		
	r_{gesamt}	r_{Frauen}	$r_{\text{Männer}}$
Vergleichsgruppe I (37♀, 114♂, 151 gesamt)	0,7990	0,8940	0,6750
Vergleichsgruppe II (89♀, 61♂, 150 gesamt)	0,9025	0,9485	0,8275

Bei den beiden Kollektiven der zwei Vergleichsgruppen ist eindeutig eine hoch signifikante Korrelation zwischen Ausgangsaktivität und Senkung vorhanden . Bei meinem Kollektiv hingegen findet sich , wie schon erwähnt , keine signifikante Korrelation (vgl. Abb. 12 und Tabelle IV) . Außerdem ist aus den Diagrammen der Abb. 12 , 19 und 20 zu sehen :
Je weiter die Punktwolken von der "Null-Geraden" ent-

Abb. 19 : Diagramm der Korrelation zwischen Ausgangs-
aktivität (AA) und Senkung für die 151
Probanden der Vergleichsgruppe I
($c_{\text{DFP}} = 4,80 \times 10^{-9}$ molar)

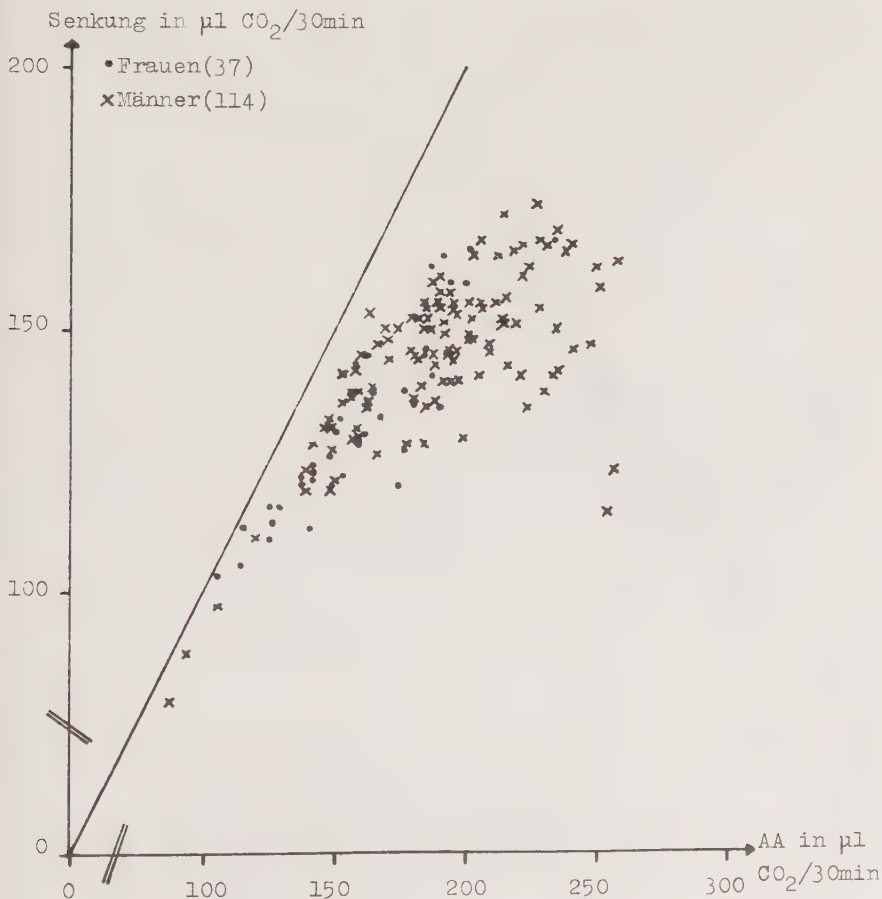
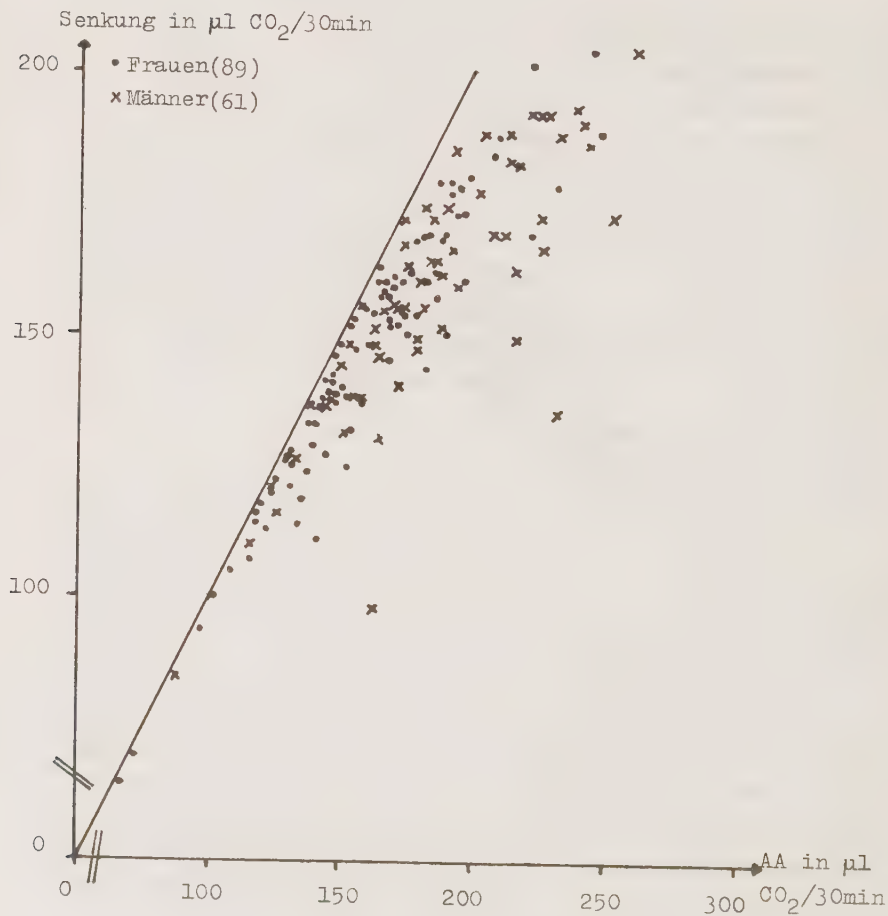


Abb. 20 : Diagramm der Korrelation zwischen Ausgangs-
aktivität (AA) und Senkung für die 150
Probanden der Vergleichsgruppe II
($c_{\text{DFP}} = 5,89 \times 10^{-9}$ molar)



fernt sind , je geringer die DFP-Konzentration , desto weniger deutlich ist die Korrelation zwischen Ausgangsaktivität und Senkung .

Man könnte daraus folgern : Entfernt man sich nur genügend weit von der "Null-Geraden" indem man die DFP-Konzentration genügend klein wählt , so verteilen sich die Punkte im Diagramm derart , daß keinerlei signifikante Korrelation zwischen Ausgangsaktivität und Senkung besteht . Bei höheren DFP-Konzentrationen ist diese Tatsache nicht gegeben , da wegen der geringen Ausgangsaktivitätswerte die Senkungswerte sehr groß sind und somit die Punkte knapp unter der "Null-Geraden" liegen . Damit wird eine Korrelation praktisch nur "vorgetäuscht" . Entfernt man sich nämlich von der "Null-Geraden" , werden sofort die Korrelationskoeffizienten kleiner (vgl. Tabelle IV und VII) .

Da stets die Ausgangsaktivität größer als die Senkung ist , können die Punkte niemals oberhalb der "Null-Geraden" liegen . Deshalb ist auch das Modell der einfachen Regression hier nicht besonders sinnvoll , sondern muß abgewandelt werden . Um dies besser verständlich zu machen , sei kurz das Modell der einfachen Regression erläutert . Es wird hierbei folgende Modellgleichung angenommen :

$$y_i = \alpha + \beta x_i + \varepsilon_i \quad ; i = 1, 2, 3, 4, \dots, n$$

mit

α = theoretischer Achsenabschnitt	} der
β = theoretische Steigung	
} Regressionsgeraden	
x_i = Ausgangsaktivität für Proband Nr. i	
y_i = Senkung für Proband Nr. i	
ε_i = Abweichung des Probanden Nr. i von der	
Regressionsgeraden	

Man geht dabei beim Modell der einfachen Regression davon aus , daß die ε_i normalverteilt sind mit der unbekannten Standardabweichung σ . Die Abbildungen 21 und 22 sollen diese Zusammenhänge verdeutlichen .

Abb. 21 : Senkung in Abhängigkeit von der Ausgangsaktivität für einen beliebigen Probanden Nr. i ; in das Diagramm eingezeichnet die "Null-Gerade" und eine willkürliche Regressionsgerade

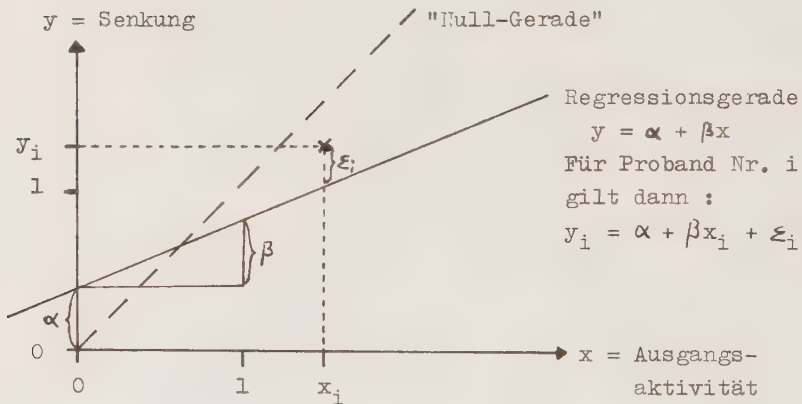
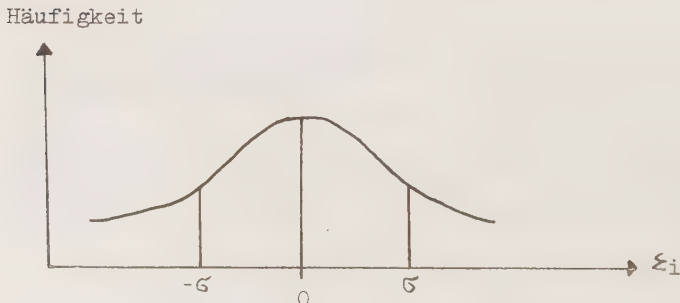


Abb. 22 : Normalverteilung der ε_i -Werte



Nun wären nach dem einfachen Modell der Regression auch Werte von ξ_i möglich, die besagen würden, daß ein y_i -Wert oberhalb der "Null-Geraden" liegt. Das kann aber nicht sein, da stets gelten muß:

$$\begin{aligned} & \text{Senkung} \leq \text{Ausgangsaktivität} \\ \text{bzw.} \quad y_i & \leq x_i \end{aligned}$$

Es können deshalb bestimmte ξ_i -Werte überhaupt nicht vorkommen. Anders ausgedrückt: ξ_i kann nicht normalverteilt sein!

Man muß daher ein anderes Modell als das der einfachen Regression verwenden. ξ_i muß so gewählt werden, daß stets die Voraussetzung erfüllt wird:

$$\begin{aligned} & \text{Senkung} \leq \text{Ausgangsaktivität} \\ \text{bzw.} \quad y_i & \leq x_i \end{aligned}$$

Dieses neue Modell sieht so aus, daß die Gleichung der Regressionsgeraden dieselbe bleibt. Lediglich alle die ξ_i -Werte muß man ausschließen (zensurieren), für die gelten würde:

$$\begin{aligned} & \text{Senkung} > \text{Ausgangsaktivität} \\ \text{bzw.} \quad y_i & > x_i \\ \alpha + \beta x_i + \xi_i & > x_i \\ \xi_i & > (1 - \beta) x_i - \alpha \end{aligned}$$

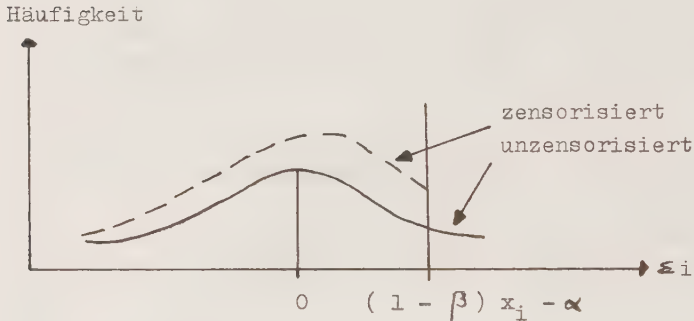
ξ_i darf somit alle Werte annehmen, außer:

$$\xi_i > (1 - \beta) x_i - \alpha$$

Die Abb. 23 zeigt die Verteilung dieser zensurisierten ξ_i -Werte im Vergleich zu den unzensurisierten (normalverteilten) ξ_i -Werten. Da die Fläche unter den Kurven immer gleich 100% sein muß, ergeben sich unterschiedliche Kurvenverläufe. Die Kurve der zen-

ensorierten Verteilung ist in dem Bereich , in dem Werte auftreten dürfen , entlang der Ordinate um einen konstanten Faktor gestreckt .

Abb. 23 : Verteilung der zensorierten und unzensorierten ξ_i -Werte



Bei der gewöhnlichen Regression , bei der ξ_i normalverteilt ist , lassen sich α und β sowie σ nach dem "Prinzip der kleinsten Quadrate" von Gauß (KREYSZIG 1973) schätzen .

Bei zensorierten ξ_i -Werten allerdings versagt dieses Prinzip . Man verwendet deshalb zur Schätzung von α , β und σ die "Maximum - Likelihood - Schätzung" : α , β und σ werden so bestimmt , daß den erhaltenen Werten die größte "Mutmaßlichkeit" , "Plausibilität" zukommt .

Die Schätzungen wurden durch ein eigens für dieses Problem erstelltes Computerprogramm bestimmt . Dieses basierte auf der Methode des Iterationsverfahrens : Man gibt zunächst einigermaßen "plausible" Startwerte für die Schätzung ein . Im Programm werden dann , falls die Startwerte "genügend gut" waren , verbesserte

Schätzungen bestimmt . Maßzahl für die "Güte" einer Schätzung ist die Likelihood L . Diese Prozedur wurde solange wiederholt , bis eine Konvergenz der Werte erzielt war .

Man erhielt somit die Werte $\hat{\alpha}$ (theoretischer Achsenabschnitt der Regressionsgeraden) , $\hat{\beta}$ (theoretische Steigung der Regressionsgeraden) und $\hat{\sigma}$ (Standardabweichung der ξ_i -Werte) .

Damit hatte man die "plausibelste" Regressionsgerade $y = \hat{\alpha} + \hat{\beta}x$ gefunden .

Es stellt sich aber bei der Betrachtung der Diagramme der Abb. 12 , 19 und 20 die Frage , ob nicht die Senkung unabhängig von der Ausgangsaktivität immer gleich groß ist . Die Regressionsgerade besäße dann die Steigung $\beta = \text{Null}$. Um die Plausibilität einer derartigen Regressionsgeraden zu prüfen , stellte man die Hypothese auf , die Steigung der Regressionsgeraden wäre gleich Null (Nullhypothese) .

Daraus folgt , da $\beta = \text{Null}$:

$$y_i = \alpha + \xi_i$$

Man erhält , verfährt man mit der Schätzung analog dem oben beschriebenen Verfahren , somit die Werte $\hat{\alpha}$ (theoretischer Achsenabschnitt der Regressionsgeraden mit der Steigung $\beta = \text{Null}$) und $\hat{\sigma}$ (Standardabweichung der ξ_i -Werte) .

Damit stehen die Werte fest für :

Nullhypothese (Regressionsgerade mit Steigung $\beta = \text{Null}$) $\hat{\alpha}$, $\hat{\sigma}$.

Gegenhypothese (Regressionsgerade mit Steigung β verschieden von Null) $\hat{\alpha}$, $\hat{\beta}$, $\hat{\sigma}$.

Will man nun die Plausibilität der Nullhypothese testen , so muß man entsprechend dem Likelihood-Quotienten-Test (KENDALL et STUART 1967) verfahren .

Es errechnet sich hierbei die Statistische Testgröße T nach folgender Formel :

$$T = 2 \frac{\ln L (\hat{\alpha} , \hat{\beta} , \hat{\zeta})}{\ln L (\hat{\alpha} , 0 , \hat{\zeta})}$$

oder umgeformt :

$$T = 2 \left[\ln (\hat{\alpha} , \hat{\beta} , \hat{\zeta}) - \ln (\hat{\alpha} , 0 , \hat{\zeta}) \right]$$

Der errechnete T-Wert ist nun einfach mit den kritischen Werten der χ^2 - Verteilung mit einem Freiheitsgrad zu vergleichen . Aus statistischen Tafelwerken sind jetzt nur noch die entsprechenden Werte der kritischen Wahrscheinlichkeit P zu entnehmen .

Dieses Programm wurde mit den beiden Vergleichsgruppen I und II , sowie mit meinen eigenen Ergebnissen durchgeführt . Das Resultat dieses Programmes gibt die Tabelle VIII wieder . Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Likelihoodwerte L , sowie die Werte der Statistischen Testgröße T weggelassen und gleich die aus statistischen Tafelwerken entnommenen Werte der kritischen Wahrscheinlichkeit P angegeben .

Tabelle VIII : Werte der Nullhypothese ($\hat{\alpha}, \hat{\beta}, \hat{\sigma}$) und der Gegenhypothese (α, β, σ) sowie die dazugehörigen kritischen Wahrscheinlichkeiten P für die drei Untersuchungskollektive

	Nullhypothese		Gegenhypothese			kritische Wahrscheinlichkeit P
	$\hat{\alpha}$	$\hat{\sigma}$	α	β	σ	
Kollektiv der Vergleichsgruppe I (151 gesamt)	147,4	15,60	90,5	0,2888	11,72	«0,00001
Kollektiv der Vergleichsgruppe II (150 gesamt)	178,7	20,66	96,0	0,3808	13,84	0,00005
Eigenes Kollektiv (80 gesamt)	51,8	22,12	31,9	0,1014	21,78	0,118
Eigenes Kollektiv (40 Frauen)	49,0	20,04	28,1	0,1139	19,64	0,211
Eigenes Kollektiv (40 Männer)	54,7	23,69	42,0	0,0603	23,58	0,555

Geht man davon aus , die Steigung der Regressionsgeraden sei gleich Null (Nullhypothese) , so beträgt die Wahrscheinlichkeit , ein Versuchsergebnis mit einer derart deutlichen Steigung wie Vergleichsgruppe I zu erhalten sehr viel weniger als 0,01 Promille . Für ein Versuchsergebnis mit einer ebenso deutlichen Steigung wie Vergleichsgruppe II beträgt die Wahrscheinlichkeit ebenfalls nur 0,05 Promille .

Für mein eigenes Kollektiv hingegen beträgt die Wahrscheinlichkeit , ein Versuchsergebnis wie das vorliegende zu erhalten 11,8% für alle Probanden , 21,1% für die Frauen und sogar 55,5% für die Männer ; immer vorausgesetzt , die Steigung β der Regressionsgeraden sei gleich Null (Nullhypothese) .

Damit ist zumindest für meine Ergebnisse sehr plausibel , daß nichts gegen die Hypothese einer Regressionsgeraden mit der Steigung $\beta = \text{Null}$ (Nullhypothese) spricht .

Auf Grund der Anordnung der Warburg-Apparatur ist die Meßgenauigkeit für Aktivitäten unter 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ sehr gering . Deshalb und aus statistischen Überlegungen wurde der Versuch unternommen , alle Restaktivitäten unter einem Wert von 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ gleich 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ zu setzen .

Alle RA-Werte < 10 wurden somit ausgeschlossen (zensuriert) . Es mußte daher gelten :

$$\text{RA} \geq 10$$

$$\text{AA} - \text{Senkung} \geq 10$$

$$\text{AA} \geq 10 + \text{Senkung}$$

$$\text{AA} - 10 \geq \text{Senkung}$$

Da bei meinen Ergebnissen keine $\text{RA} < 10 \mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ auftraten , erübrigte sich hier diese Maßnahme . Allerdings wurden bei der Vergleichsgruppe I 7 Werte und bei der Vergleichsgruppe II 54 Werte der Restaktivität , die unter 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ lagen , gleich 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ gesetzt .

Es ergaben sich damit folgende "manipulierte" Werte für die Nullhypothese $(\hat{\alpha}, \hat{\sigma})$ und die Gegenhypothese $(\hat{\alpha}, \hat{\beta}, \hat{\sigma})$ sowie die dazugehörigen kritischen Wahrscheinlichkeiten P (Tabelle IX) .

Tabelle IX : Werte der Nullhypothese ($\hat{\alpha}, \hat{\beta}, \hat{\gamma}$) und der Gegenhypothese ($\hat{\alpha}, \hat{\beta}, \hat{\gamma}$) sowie die dazugehörigen kritischen Wahrscheinlichkeiten P für Vergleichsgruppe I und II unter der Annahme , alle RA-Werte kleiner 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ gleich 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$

	Null-hypothese		Gegen-hypothese			kritische Wahrscheinlichkeit P
	$\hat{\alpha}$	$\hat{\gamma}$	$\hat{\alpha}$	$\hat{\beta}$	$\hat{\gamma}$	
Kollektiv der Vergleichsgruppe I 151 gesamt , davon 7 Werte <10	149,8	13,28	116,4	0,1649	11,44	0,00072
Kollektiv der Vergleichsgruppe II 150 gesamt , davon 54 Werte <10	—	—	—	—	—	" groß " 1)

1) Das Iterationsverfahren führte hier zu keinem vernünftigen Ergebnis , da die Werte nicht konvergierten . Als Ursache dafür darf wohl angenommen werden , daß über 1/3 der Vergleichsgruppe II unter die Manipulation fielen . Die Tatsache , daß während des Iterationsverfahrens für $\beta = \text{Null}$ absolut betrachtet auch kleinere $\ln L$ - Werte auftraten als für β verschieden Null , läßt auf ähnliche $\ln L$ - Werte für $\beta = \text{Null}$ und β verschieden Null schließen . Das bedeutet aber nichts anderes , als daß T sehr klein und somit P sehr groß wird . P wird wohl daher sehr wahrscheinlich im Bereich $0,1 < P < 0,5$ liegen .

Wie aus der Tabelle IX ersichtlich , wird es auch für Vergleichsgruppe I und II durch eine Zensorisierung

der Restaktivitätswerte ein wenig plausibler , daß nichts gegen die Hypothese einer Regressionsgeraden mit der Steigung $\beta = \text{Null}$ spricht .

Zusammenfassend kann man somit sagen :

Je geringer die DFP-Konzentration gewählt wird , desto plausibler wird die Möglichkeit , daß man eine Regressionsgerade mit der Steigung $\beta = \text{Null}$ durch die Punktwolke legen kann . Das bedeutet aber nichts anderes , als daß für jede beliebige Ausgangsaktivität bei einer bestimmten DFP-Konzentration immer die gleiche Senkung gilt .

Biologisch wäre das so zu deuten , daß das DFP im menschlichen Serum nicht enzymatisch abgebaut wird , sondern an Eiweißkörper im Blut gebunden wird . Man könnte sich das so vorstellen , daß die reaktiven Orte der Proteine im Serum mit DFP titriert werden . Die Bindung des DFP an die Proteine erfolgt dabei letztlich - wie bereits im Abschnitt I la beschrieben - in Form von DIP an einen Serinrest des Proteins (OOSTERBAAN et al. 1958 , WÄHLBY 1968 , WÄHLBY et al. 1966 , 1968) . Diese Bindung ist dann irreversibel und das DIP wird erst wieder frei und ausgeschieden , wenn das Protein metabolisiert wurde . Bevor das DIP irreversibel an den Serinrest gebunden wird , reagiert es bekanntlich primär mit einem Histidinrest des Proteins (NEURATH 1965 , MOUNTER et al. 1957) , ist dort noch reversibel gebunden und wandert schließlich zu seiner endgültigen Bindungsstelle , dem Serinrest (WOOTON et al. 1960) .

Hinweis auf eine derartige Titration der Bluteiweißkörper mit DFP liefert auch schon eine Zensorisierung der Restaktivitätswerte bei höheren DFP-Konzentrationen der Vergleichsgruppen I und II . Werden nämlich

alle Restaktivitäten kleiner 10 μ l CO₂/30min ausgeschlossen (zensorisiert) , wird die Möglichkeit einer Regressionsgeraden mit der Steigung β = Null ebenfalls plausibel (vgl. Tabelle IX) . Offensichtlich ist aber die zensorisierte Normalverteilungsannahme in der Nähe der "Null-Geraden" für kleine Werte der Ausgangsaktivität ungenügend erfüllt . Entfernt man sich nämlich durch eine geeignete Wahl der DFP-Konzentration von der "Null-Geraden" , so wird die Möglichkeit einer Regressionsgeraden mit der Steigung β = Null immer plausibler (vgl. Tabelle VIII) . Unabhängig von der Ausgangsaktivität ist die Senkung immer gleich groß . Das würde biologisch für eine Titration der Bluteiweißkörper mit DFP sprechen .

VII. Zusammenfassung

Bei dem Vergleich meiner eigenen Ergebnisse mit denen früherer Arbeitsgruppen (SWOBODA 1981) hinsichtlich der Restaktivitäten der Serum-ChE nach Vergiftung mit DFP stellte sich folgendes heraus :

Bezüglich der Korrelation Ausgangs- zu Restaktivität bestehen keinerlei Unterschiede . Bei allen drei Arbeitsgruppen (Vergleichsgruppe I , Vergleichsgruppe II , eigene Ergebnisse) waren ähnlich hohe , signifikante Korrelationskoeffizienten aufgetreten . Damit kann als gesichert angenommen werden , daß Probanden mit hohen Ausgangsaktivitäten nach Vergiftung mit DFP auch hohe Restaktivitäten besitzen ; und umgekehrt Personen mit niedrigen Ausgangsaktivitäten auch niedrige Restaktivitäten .

Der Schluß daraus , daß somit die Differenz Ausgangsminus Restaktivität (Senkung) immer ähnlich groß ist , bestätigte sich allerdings nur bedingt bei meinen eigenen Ergebnissen . Denn während die beiden Vergleichsgruppen zwischen Ausgangsaktivitäten und Senkung noch hohe Korrelationskoeffizienten aufwiesen , korrelierte bei mir Ausgangsaktivität und Senkung nicht mehr ($r = 0,1742$ für alle 80 Probanden) .

Geht man davon aus , daß bei Vergleichsgruppe I und II die hohen Korrelationskoeffizienten durch die Nähe der "Null-Geraden" bedingt sind , so wird der Versuch verständlich , bei meinen Ergebnissen die Hypothese einer Regressionsgeraden mit der Steigung $\beta = \text{Null}$ aufzustellen . Unter der Annahme , es treffe diese Nullhypothese zu , beträgt die Wahrscheinlichkeit , ein derartiges Versuchsergebnis wie das meine zu erhalten , für alle 80 Probanden 11,8% und sogar 55,5% für die 40 Männer . Damit wird die Nullhypothese sehr

plausibel . Da die Meßgenauigkeit für Aktivitäten unter 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ ziemlich gering ist , wurden sämtliche Werte der Restaktivität kleiner 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ gleich 10 $\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$ gesetzt . Diese Maßnahme betraf allerdings nur die beiden Vergleichsgruppen . Durch diese "schwache Manipulation" wurde jetzt auch für die Vergleichsgruppen die Nullhypothese einigermaßen plausibel .

Daraus läßt sich nun folgern , daß die Senkung unabhängig von der Ausgangsaktivität immer gleich groß ist . Die Streuungen im Diagramm wären somit allein meß- und versuchsbedingt .

Ein derartiger Zusammenhang zwischen Ausgangsaktivität und Senkung würde allerdings biologisch bedeuten , daß das DFP in den hier verwendeten Konzentrationen und unter diesen Bedingungen im menschlichen Blut nicht von einer "DFP-ase" abgebaut wird , da dann stärkere Unterschiede bei den einzelnen Probanden zu erwarten gewesen wären ; d.h. die Senkungen müßten von Person zu Person verschieden sein .

Somit kann man davon ausgehen , daß das DFP im menschlichen Serum möglicherweise einer Titration unabhängig vom Probanden unterlag . Diese Titration kommt dadurch zustande , daß Eiweißkörper im Blut das DFP binden und somit die Giftwirkung , die ja in einer Blockade der Acetylcholinesterase begründet liegt , nicht mehr zur Geltung kommt . Die Bindung des DFP erfolgt hierbei in Form von DIP an einen Serinrest des Proteins (OOSTERBAAN et al. 1958 , WÄHLBY 1968 , WÄHLBY et al. 1966 , 1968) . Die Ausscheidung des DIP erfolgt schließlich über Galle und Urin , wenn das Protein verstoffwechselt wurde (COHEN et WARRINGA 1954) .

Allerdings kann ein endgültiger Beweis der Modellvorstellung einer Titration der Bluteiweißkörper mit DFP in dem verwendeten Konzentrationsbereich und den hier herrschenden Bedingungen erst erbracht werden , wenn weitere Arbeiten mit ähnlichen DFP-Konzentrationen vorliegen . Außerdem müssen noch andere Meßmethoden als die der Anti-ChE-Technik mit der Warburg-Apparatur angewendet werden , um diese Hypothese wissenschaftlich zu erhärten . Zu denken wäre hierbei etwa auch an photometrische Meßmethoden .

VIII. Literaturverzeichnis

Aldridge, W.N. :

Serum Esterases . 1. Two Types of Esterase (A and B) Hydrolysing p-nitrophenyl Acetate , Propionate and Butyrate , and a Method for their Determination
Biochem. J. 53:110 (1953a)

Aldridge, W.N. :

Serum Esterases . 2. An Enzyme Hydrolysing Diethyl p-nitrophenyl Phosphate (E 600) and its Identity with the A-Esterase of Mammalian Sera
Biochem. J. 53:117 (1953b)

Ammon, R. :

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins
Pflügers Arch. ges. Physiol. 233:486 (1934)

Anderson, V. and Sölvsen, S. :

Esterase Activity of Leucocyte Proteins and their Labelling with Radioactive Diisopropylfluorophosphate
Experientia 19:257 (1953)

Barr, R.D. , Ross, S.A.G. , Mc Intosh, J.A. and Williams, J.C. :

Physical Influence on the in Vitro Binding of Diisopropylfluorophosphate (DF³²P) to Human Erythrocytes
Med. Lab. Technol. 32:41 (1975)

Bendtsen, K. :

Human Leucocyte Migration Inhibitory Factor (LIF)
1. Effect of Synthetic and Naturally Occuring Esterase and Protease Inhibitors
Scand. J. Immunol. 6:125 (1977)

- Berends, F. , Posthumus, C.H. , Sluys, J.v.D. and
Deyerkau, F.A. :
The Chemical Basis of the "Ageing Process" of
DFP-Inhibited Pseudocholinesterase
Biochem. Biophys. Acta 34:576 (1959)
- Cohen, J.A. and Warringa, M.G.P.J. :
The Fate of ^{32}P Labelled Diisopropylfluorophos-
phonate in the Human Body and its Use as a
Labelling Agent in the Study of Turnover of
Blood Plasma and Red Cells
J. Clin. Invest. 32:459 (1954)
- Cohen, J.A. and Warringa, M.G.P.J. :
Purification and Properties of Dialkylfluoro-
phosphatase
Biochem. Biophys. Acta 26:29 (1957)
- Friedberg, K.D. und Sakai, P. :
Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkyl-
phosphaten (E 600 , E 605 , Systox) im Blut und
Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden
Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid = PAM)
Dtsch. Z. ges. gericht. Med. 47:580 (1958)
- Forth, W. , Henschler, D. und Rummel, W. :
in Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und
Toxikologie : Seite 93ff
Wissenschaftsverlag Bibliographisches Institut ,
Mannheim , Wien , Zürich (1975)
- Freedman, A.M. , Willis, A. and Himwich, H.E. :
Correlation between Signs of Toxicity and Cholin-
esterase Level of Brain and Blood during Recovery
from Diisopropylfluorophosphate (DFP) Poisoning
Am. J. Physiol. 157:80 (1949)

Geldmacher-von Mallinckrodt, M. , Rabast, U. und
Lindorf, H.H. :

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
Cholinesterasen mit E 600

Arch. Toxikol. 25:226 (1969)

Gellman, M.A. :

The Use of Miotics for the Correction of
Hypermetropia and Accomodative Esotropia

Am. J. Optom. 40:93 (1963)

Gellman, M.A. :

The Use of Drugs in the Diagnostics and
Treatment of Strabismus

Am. J. Optom. 41:574 (1964)

Hansen, D. , Schaum, E. und Wassermann, O. :

Organverteilung und Stoffwechsel von Diiso-
propylfluoro-phosphat (DFP) beim Meer-
schweinchen

Arch. Toxikol. 23:73 (1968a)

Hansen, D. , Schaum, E. and Wassermann, O. :

Serum Level and Excretion of Diisopropyl-
fluoro-phosphate (DFP) in Cats

Biochem. Pharmacol. 17:1159 (1968b)

Harlander, F. :

Dissertation , Erlangen ; in Vorbereitung (1981)

Hawkins, R.D. and Mendel, B. :

Selective Inhibition of Pseudo-Cholin-
esterase by Diisopropylfluoro-phosphate

Brit. J. Pharmacol. 2:173 (1947)

- Hjort, P.F. , Paputchis, H. and Cheney, B. :
Labelling of Red Blood Cells with Radioactive
Diisopropylfluoro-phosphate (DF³²P) , Evidence
for an Initial Release of Label
J. Lab. & Clin. Med. 55:416 (1960)
- Horton, R.G. , Koelle, G.B. , Mc Namara, B.P. and
Pratt, H.J. :
The Acute Toxicity of Diisopropylfluoro-phosphate
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 87:414 (1946)
- Jandorf, B.J. and Mc Namara, P.D. :
Fed. Proc. 8:210 (1949)
zit. n. Jandorf, B.J. et al. (1950)
- Jandorf, B.J. and Mc Namara, P.D. :
Distribution of Radiophosphorus in Rabbit Tissues
after Injection of Phosphorus-Labelled Diiso-
propylfluoro-phosphate
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 98:77 (1950)
- Jansz, H.S. , Brons, D. and Warringa, M.G.P.J. :
Chemical Nature of the DFP-Binding Site of
Pseudocholinesterase
Biochem. Biophys. Acta 34:573 (1959)
- Kendall, M. and Stuart, A. :
The Advanced Theory of Statistics
Bd. 2 : Inference and Relationship
2. Auflage , Seite 224ff
Charles Griffin & Company , London (1967)
- Koelle, G.B. and Gilman, A. :
The Relationship between Cholinesterase
Inhibition and the Pharmacological Action
of Diisopropylfluoro-phosphate (DFP)
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 87:421 (1946)

Kreyszig, E. :

Statistische Methoden und ihre Anwendungen

4. Auflage , Seite 259ff

Vandenhoeck & Ruprecht , Göttingen (1973)

Kurth, D. , Athens, J.W. , Cronkite, E.P. , Cartwright,
G.E. and Wintrobe, M.M. :

Leucokinetic Studies V. Uptake Tritiated

Diisopropylfluoro-phosphate by Leucocytes

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 107:422 (1961)

Lange, W. und von Krüger, G. :

Ester der Monofluorphosphorsäure

Berichte der dtsh. chem. Ges. 65:1598 (1932)

Iatki, O. und Erdmann, W.D. :

Hemmung und Reaktivierung von Cholinester-

asen nach Vergiftung mit Paraoxon und DFP

in vitro

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.

Pharmakol. 240:514 (1961)

Leopold, J.H. and Comroe, J.H.jr. :

Effect of Diisopropylfluoro-phosphate (DFP)
in the Normal Eye

Arch. Ophth. 36:17 (1946)

Lackworth, J.P. :

unveröffentlichte Arbeit (1942)

zit. n. Modell, W. et al. (1946)

Mazur, A. :

An Enzyme in Animal Tissues Capable of

Hydrolysing the Phosphorus-Fluorine

Bond of Alkyl Fluorophosphates

J. Biol. Chem. 164:271 (1946)

Mazur, A. and Bodansky, O. :

The Mechanism of in Vitro and in Vivo
Inhibition of Cholinesterase Activity
by Diisopropylfluoro-phosphate
J. Biol. Chem. 163:261 (1946)

Mc Combie, H. and Sounders, B.C. :

Alkylfluorophosphates , Preparation and
Physiological Properties
Nature 157:287 (1946)

Modell, W. , Krop, S. , Hitchcock, P. and Riker, W.F.jr. :

General Systemic Actions of Diisopropyl-
fluoro-phosphate (DFP) in Cats
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 87:400 (1946)

Moon, A.Y. , Merconroff, J. and Hess, G.P. :

Charakterization of a Reversibly Formed
Enzym Complex in the Reaction of Chymo-
trypsin with Diisopropylfluoro-phosphate
J. Biol. Chem. 240:717 (1965)

Mounter, L.A. :

Some Studies of Enzymatic Effects of
Rabbit Serum
J. Biol. Chem. 209:813 (1954)

Mounter, L.A. :

The Complex Nature of Dialkylfluorophos-
phatases of Hog and Rat Liver and Kidney
J. Biol. Chem. 215:705 (1955)

Mounter, L. A. :

Metabolism of Organophosphorus Anticholin-
esterase Agents
in : Handbuch der Experimentellen Pharma-
kologie Bd. 15:486 , Springer Verlag ,
Berlin , Göttingen , Heidelberg , heraus-
gegeben von Koelle, G.B. (1963)

- Mounter, L.A. and Chanutin, A. :
Dialkylfluorophosphatase of Kidney
II. Studies of Activation and Inhibition
by Metals
J. Biol. Chem. 204:837 (1953a)
- Mounter, L.A. , Floyd, C.S. and Chanutin, A. :
Dialkylfluorophosphatase of Kidney
I. Purification and Properties
J. Biol. Chem. 204:221 (1953b)
- Mounter, L.A. and Chanutin, A. :
Dialkylfluorophosphatase of Kidney
III. Studies of Activation and Inhibition
by Cofactors
J. Biol. Chem. 210:219 (1954)
- Mounter, L.A. , Baxter, R.F. and Chanutin, A. :
Dialkylfluorophosphatases of Microorganisms
J. Biol. Chem. 215:699 (1955a)
- Mounter, L.A. , Dien, L.T.H. and Chanutin, A. :
The Distribution of Dialkylfluorophosphatases
in the Tissues of Various Species
J. Biol. Chem. 215:691 (1955b)
- Mounter, L.A. and Dien, L.T.H. :
Dialkylfluorophosphatase of Kidney
V. The Hydrolysis of Organophosphorus
Compounds
J. Biol. Chem. 219:685 (1956)
- Mounter, L.A. , Alexander, H.C. , Tuck, K.D. and
Dien, L.T.H. :
The pH Dependence and Dissociation Constants
of Esterases and Proteases Treated with
Diisopropylfluoro-phosphate
J. Biol. Chem. 226:867 (1957)

Murachi, T. :

A General Reaction of Diisopropylfluorophosphate with Proteins without Direct Effect on Enzymic Activities
Biochem. Biophys. Acta 71:239 (1963)

Nachmansohn, D. , Rothenberg, M.A. and Feld, E.A. :

The in Vitro Reversibility of Cholinesterase Inhibition by Diisopropylfluorophosphate (DFP)
Arch. Biochem. 14:197 (1947)

Nachmansohn, D. , Rothenberg, M.A. and Feld, E.A. :

Studies on Cholinesterase
V. Kinetics of the Enzym Inhibition
J. Biol. Chem. 174:247 (1948)

Neurath, A.R. :

A Component Splitting Diisopropylfluorophosphate in Sendai and Newcastle Disease Virus Preparations ; its Possible Identity with Haemolysin
Acta virol. 9:25 (1965)

Nowotny, P. , Preußner, S. , Konrad, H. und

Kiencke, H. :

Granulozytenkinetik mit radioaktivem Diisopropylfluorophosphat (DF³²P)
Folia haematol. 94:326 (1970)

Oosterbaan, R.A. , Kunst, P. , v. Rotterdam, J. and

Cohen, J.A. :

The Reaction of Chymotrypsin and Diisopropylphosphorofluoridate
II. The Structure of Two DP-Substituted Peptides from Chymotrypsin-DP
Biochem. Biophys. Acta 27:556 (1958)

Quilliam, J.P. :

Di-Iso-Propylfluorophosphonate (DFP)
Its Pharmacology and its Therapeutic Uses
in Glaucoma and Myasthenia Gravis
Post-Grad. M. J. 23:280 (1947)

Ramachandran, B.V. :

Catalytic Effect of Phosphate and Oximes
on Non-Enzymic Hydrolysis of Diisopropyl-
phosphorofluoridate
Indian J. Biochem. Biophys. 8:112 (1971)

Rump, S. , Galecka, E. , Grudzinska, E., Jiozuk, I.
and Rabsztyn, T. :

New Trends in Experimental Therapie of
Organophosphate Intoxications
Environ. Qual. Saf. 3:609 (1975)

Schrader, G. :

Die Entwicklung neuer insektizider
Phosphorsäureester
Seite 105ff
Verlag Chemie GmbH , Weinheim/Bergstr. (1963)

Süllmann, E. :

Manometrische Methoden zur Untersuchung des
Gewebsstoffwechsels
in : Handbuch der Physiol.- und Pathol.
Chemischen Analyse ; Bd. VI-A
Springer Verlag , Berlin , Heidelberg , New York
herausgegeben von Land, K. und Lehnartz, E. (1964)

Silver, S.D. :

The Toxicity of Dimethyl- , Diethyl- and
Diisopropylfluorophosphate Vapors
J. Indust. Hyg. & Toxicol. 30:307 (1948)

Swoboda, P.-M. :

Dissertation , Erlangen ; in Vorbereitung (1981)

Verbeke, R. :

Sûr la Pharmacologie du Di-isopropyl

Fluorophosphonate (DFP)

Arch. int. pharmacodyn. 75:415 (1948)

Verbeke, R. :

Nouvelles Contribution à la Pharmacologie

du Di-isopropyl Fluorophosphonate (DFP)

Arch. int. pharmacodyn. 79:1 (1949)

Victor, N. , Hörmann, A. und Eder, L. :

Statsys , Beschreibung und Anleitung mit

speziellen Hinweisen zur Benutzung der

Programme unter dem Betriebssystem BSV

der Siemens 4004/46

Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung

mbH München , Institut für Med. Datenverarbei-

tung , GSF-Bericht MD 24 (März 1973)

Wählby, S. , Engström, L. , Bjars, U. and

Hofstein, B. :

Reaction of an Extracellular Proteolytic

Enzyme from a Strain of Arthrobacter with

Diisopropylphosphofluoridate (DFP)

Acta Chem. Scand. 20:1993 (1966)

Wählby, S. and Engström, L. :

Studies on Streptomyces Griseus Protease

II. The Amino Acid Sequence around the

Reactive Serin Residue of DFP-Sensitive

Components with Esterase Activity

Biochem. Biophys. Acta 151:402 (1968)

Wahlby, S. :

The Primary Structure at the DFP-Reacting
Site of a Proteolytic Enzym from a Strain
of *Arthrobacter*
Biochem. Biophys. Acta 151:409 (1968)

Wootton, J.F. and Hess, G.P. :

Evidence for the Involvement of a Tryptophan
Residue in the Reaction of Diisopropylphosphoro-
fluoridate with α -Chymotrypsin
Nature 188:726 (1960)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling für die Möglichkeit , in seinem Institut zu arbeiten , und für die Übernahme des Korreferates , sowie Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-von Mallinckrodt für die Überlassung des Themas und ihre stete Bereitschaft , mich bei dessen Bearbeitung zu unterstützen . Ferner bedanke ich mich bei den Herren Dr. G. Hommel und E. Schmitt , die mir bei der Computerauswertung meiner eigenen Ergebnisse behilflich waren . Die Computerauswertung der Vergleichsgruppen I und II verdanke ich den Herren P.-M. Swoboda und F. Harlander .

Lebenslauf

Ich , Thomas Heinz Jahn , wurde am 28. Mai 1956 als erstes von zwei Kindern des Ehepaares Hans und Hannelore Jahn in Sonnefeld , Kreis Coburg geboren . Nach 4 Jahren Volksschule von 1962 bis 1966 in Hilpoltstein (Mfr.) , trat ich an das Descartes-Gymnasium in Neuburg/Donau über . Hier besuchte ich zunächst den humanistischen Zweig , wechselte aber mit der Wahl des Französischen als dritter Fremdsprache in den neusprachlichen Zweig . Bedingt durch eine Versetzung meines Vaters erfolgte 1971 der Wechsel an den neusprachlichen Zweig des Gymnasiums Christian-Ernestinum in Bayreuth . Dort schloß ich auch meine Gymnasialzeit mit dem Erhalt des Reifezeugnisses im Juni 1975 ab . Am 1. Juli 1975 erfolgte die Einberufung zur Ableistung des Wehrdienstes in Cham (Opf.) . Da ich am 1. Dezember 1975 eine Zulassung zum Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen erhielt , wurde ich bis zu meiner Approbation vom Wehrdienst freigestellt . Nach dem 2. Semester , im Sommer 1976 , legte ich die naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung (Vorphysikum) , nach dem 5. Semester , im Frühjahr 1978 , die zahnärztliche Vorprüfung (Physikum) ab . Die zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen) bestand ich nach dem 10. Semester , im November 1980 . Die Approbation als Zahnarzt erfolgte am 28. November 1980 . Im Augenblick leiste ich meinen restlichen Wehrdienst in München auf der Sanitätsakademie als Stabsarzt ab .

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197